

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE
STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Nanovláknenné medikované membrány. 8
Nanofibre medicated membranes. 8

Iveta Kučerová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, květen 2013

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Pavlovi Doležalovi, CSc. za vedení a podporu při tvorbě práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petrovi Vrbatovi za odborné konzultace a výpomoc při zpracování výsledků. Poděkování patří také mým rodičům za podporu během studia.

OBSAH

ABSTRAKT	2
ABSTRACT	3
1 ÚVOD	4
2 ZADÁNÍ PRÁCE.....	5
3 TEORETICKÁ ČÁST	6
3.1 Výzkum perorálního podání léčiv	6
3.2 Hlavní úskalí perorální aplikace léčiv	7
3.2.1 Změny pH vyvolané onemocněním	9
3.2.2 Ochrana před vysoce kyselým prostředím žaludku.....	9
3.2.3 Zlepšení stability léčiva v gastrointestinálním traktu.....	10
3.2.4 Zlepšení rozpustnosti léčiva v horní části trávicího traktu.....	11
3.2.5 Využití nanostruktur v lékových formách k perorálnímu podání	12
3.2.6 Zvýšení přilnavosti orálních lékových forem ke sliznici	13
3.2.7 Zvýšení biologické dostupnosti špatně vstřebatelných léčiv	14
3.2.8 Výhledy optimalizace perorálního podání léčiv	16
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
4.1 Suroviny	18
4.2 Přístroje.....	18
4.3 Testované membrány.....	19
4.4 Provedení liberačních experimentů	19
4.4.1 Pilotní liberační pokusy.....	19
4.4.2 Vlastní liberační pokusy.....	20
4.4.3 Zpracování experimentálních dat	21
Vysvětlivky k protokolům.....	21
5 DOKUMENTACE	22
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	58
7 ZÁVĚRY.....	63
8 LITERATURA.....	64

ABSTRAKT

Práce v teoretické části přináší přehled informací o současném pohledu na problematiku perorálního podání léčiv z biofarmaceutického hlediska. Popisuje hlavní úskalí této aplikační cesty a uvádí vybraná fakta o nových přístupech ke zlepšování biologické dostupnosti špatně absorbovatelných látek. K těmto přístupům v posledních letech patří také využití nanovláknenných membrán.

Experimentální část je zaměřena na in vitro hodnocení liberace diaminu z nanovláknenných membrán do prostředí pufru pH 7,4. Testované membrány obsahovaly účinnou látku ve třech odstupňovaných koncentracích (20 %, 30 % a 40 %), a cíleně se lišily plošnou hmotností. K vyhodnocení rychlosti liberace využívá fluxu diaminu v prvním, lineárním úseku liberace, k hodnocení uvolnitelného podílu diaminu potom procentuální množství látky uvolněné do 60 minut. Stanovení diaminu bylo provedeno pomocí HPLC.

K uvolnění prakticky veškerého uvolnitelného podílu diaminu docházelo vždy do 15 minut od počátku liberace. Rychlost liberace diaminu z nanovláknenných membrán je tedy vysoká. Důležité je ovšem zjištění, že rychlost liberace patrně není významněji závislá na koncentraci léčiva ve vláknech membrány, ale je zásadně ovlivněna gramáží membrán. Variabilitu hodnot fluxů diaminu v počátečním 15. minutovém úseku liberace lze volbou technologie udržet úrovni 3 %, resp. 5 % relativní směrodatné odchylky. Největší, asi čtvrtinový podíl celkového obsahu léčiva se uvolnil z membrán s obsahem 20 % diaminu a nejvyšší gramáží. Nejmenší, asi osminový podíl diaminu se uvolnil z membrán se 40 % koncentrací léčiva, avšak o třetinu nižší gramáží.

Nalezená fakta poukazují na nutnost důkladného prověřování všech závislosti liberačních vlastností na technicky jinak dobře nastavitelných parametrech nanovláknenných membrán.

ABSTRACT

Thesis in theoretical part provides an overview of oral drugs in the biopharmaceutical point of view. It describes the main difficulties of this application route and presents selected facts about new approaches to improve the bioavailability of poorly absorbable substances. These approaches, in recent years, also use nanofiber membranes.

The experimental part focuses on the in vitro evaluation of diamine delivery from nanofiber membranes in vehicle buffered at pH 7.4. The tested membranes contain the active substance in three graduated concentrations (20%, 30% and 40%), and specifically differ in basic weight. To evaluate the delivery the fluxes of diamine within the first linear section of delivery are used, the percentage of substance released within 60 minutes was used to the evaluation of releasable proportion of diamine. Determination of diamine was performed by HPLC.

The release of nearly all releasable diamine amounts were always obtained in 15 minutes from the beginning of release. The release rate of the diamine from nanofiber membranes is high. Important, however, is the finding that the rate of drug release is not probably significantly dependent on the drug concentration in the nanofiber membrane, but it is significantly influenced by the basic weight of membranes.

The variability values of the diamine fluxes starting in 15th minute region of delivery can be maintained by proper technology choice on the level of 3%, respectively. 5% of relative standard deviation. Most, about one quarter of the total content of the drug, is released from the membrane containing 20% of a diamine and the highest basic weight. The smallest, about one eighth of totally loaded diamine is released from the membrane with 40% drug concentration, but having only a one third basic weights.

Found facts point to the need for a thorough examination of all liberation characteristics depending on the otherwise technically good adjustable parameters nanofiber membranes.

1 ÚVOD

Značná část výzkumů ve farmacii se zaměřuje na řešení problémů spojených se stabilizací léčiv v gastrointestinálním traktu a nalezení způsobů zlepšení biologické dostupnosti špatně absorbovatelných látek po perorálním podání. Mezi další problémy, kterým je věnována pozornost, patří nevhodné farmakokinetické vlastnosti aktivních látek, nedostatečné vstřebávání a nežádoucí účinky léčiva.

Zvýšenou pozornost proto dnes přitahují nové technologické postupy vedoucí ke zvýšení stability látek, jejich přenosu do konkrétního místa trávicího traktu, zvýšené rozpustnosti léčivých látek a zvýšení doby jejich kontaktu s absorpční plochou. Jednou z významných inovací v tomto směru se stává také využití nanovláknenných soustav pro perorální aplikaci léčiv. Těm se věnuje tato diplomová práce s tím, že je zaměřena především na získání dalších původních experimentálních výsledků, které jsou pro rozvíjení této tematiky na katedře farmaceutické technologie potřebné a budou využity při dalším výzkumu.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

1. Studium výsledků získaných na katedře v rámci diplomové práce.
 2. Obecná formulace cílů práce.
 3. Zpracování překladu daného obecných kapitol souvisejících s prací.
 4. Vyhledání aktuálních informací v elektronických databázích a časopisech.
 5. Upřesnění cíle práce.
 6. Provádění a hodnocení prvního bloku měření.
 7. Realizace dalších experimentů s následným vyhodnocením výsledků.
 8. Příprava předběžné podoby práce s formulací závěrů.
 9. Vyhotovení a kontrola konečné podoby práce.
 10. Příprava k prezentaci práce při obhajobě a stanovisek k posudku oponenta.
-
1. V teoretické části je úkolem sestavit a podat přehled o biofarmaceutických aspektech perorálního podání léčiv.
 2. Cílem experimentální části bude:
 - 2.1 Proměřit liberaci diaminu z nanovlákných membrán 3 rozdílných gramáží a 3 rozdílných koncentracích diaminu.
 - 2.2 Vyhodnotit vliv obou proměnných na vybraný liberační parametr diaminu.

Předpokládá se provedení převážné části HPLC stanovení Mgr. Petrem Vrbatou v laboratoři katedry farmaceutické technologie.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Výzkum perorálního podání léčiv

Úspěšné systémové perorální podání léčiva vyžaduje nejen výběr takové účinné látky, která selektivně dosahuje farmakologického cíle, stejně jako volbu takové lékové formy léčiva, která poskytne substanci farmakokinetický profil požadovaný k získání žádaného farmakodynamického výsledku. Většina terapeutických cílů, pro které lze snadno nalézt účinnou látku s požadovanými vlastnostmi, jakými jsou vysoká biologická dostupnost, bezpečnost a farmakokinetický profil po perorálním podání, již byla identifikována.^{1,2} Perorální podání je výhodnou aplikační cestou, snadnou a pro pacienta příjemnou, s výhodnou možností samostatné aplikace pacientem. Ve srovnání s parenterálním podáním představuje mnohem menší riziko pro přenos onemocnění, je relativně levné a zvyšuje compliance pacienta. Umožňuje navíc také řízené, flexibilní dávkování a je vhodné zvláště pro dlouhodobé léčení.^{3,4}

Technologie, které byly použity k produkci úspěšných přípravků, je účelné nadále využívat. Přitom je ovšem stále více jasné, že technologické postupy minulých let nemohou dostatečně vyhovovat potřebám podání zejména takových léčiv, která se po perorálním podání nesnadno absorbují. Mezi problémy, které je přitom potřeba řešit, patří také jejich nestabilita v gastrointestinálním traktu, špatné vstřebávání vedoucí k nízké biologické dostupnosti, nevhodné farmakokinetické vlastnosti, malá biodostupnost a nežádoucí vedlejší účinky.^{5,6}

Léčiva jsou v humánní farmakoterapii běžně podávána perorálně, nejčastěji ve formě malých až středně velkých tablet či tobolek. Farmaceutický průmysl vynakládá ročně miliardy dolarů pátráním po sloučeninách s vlastnostmi podobnými vlastnostem úspěšně již podávaných léčiv.⁷ Rozsáhlé studie prováděné předními farmaceutickými společnostmi se zaměřují na přírodní produkty, rostliny i tradiční medicínu. Některé z těchto nákladných studií byly uváděny v kombinaci s genomickými či proteomickými daty. Všechny tyto snahy přinesly ovšem jen několik málo molekul vhodných pro další průmyslový vývoj.

Farmaceutický výzkum se proto také zaměřil na způsoby, kterými lze vylepšit biologickou dostupnost terapeuticky účinných látek, které jinak nejsou považovány pro perorální podání za vhodné. Studie zaměřené na zlepšení vlastností v současné době

schválených léčiv našly a popsaly širokou škálu metod využitelných ke stabilizaci nedostatečně stabilních látek a přenosu těchto účinných látek do konkrétní části trávicího traktu.⁸ Na základě dříve získaných vědomostí se výzkumné úsilí v současnosti více zaměřuje na kroky vedoucí ke zvýšení stability a na strategie zlepšování vstřebání těchto léčiv, která se dosud po perorálním podání vstřebávat nemohla. Patří k nim celé spektrum nanostrukturních nosičů od polymerních nanočástic, přes tuhé lipidické nanočástice, samoemulgující nanosoustavy, nanokrystaly až po akvazómy.⁹

V posledních letech se k nim přiřadilo také studium nanovláknenných soustav s obsahem léčiv.¹⁰

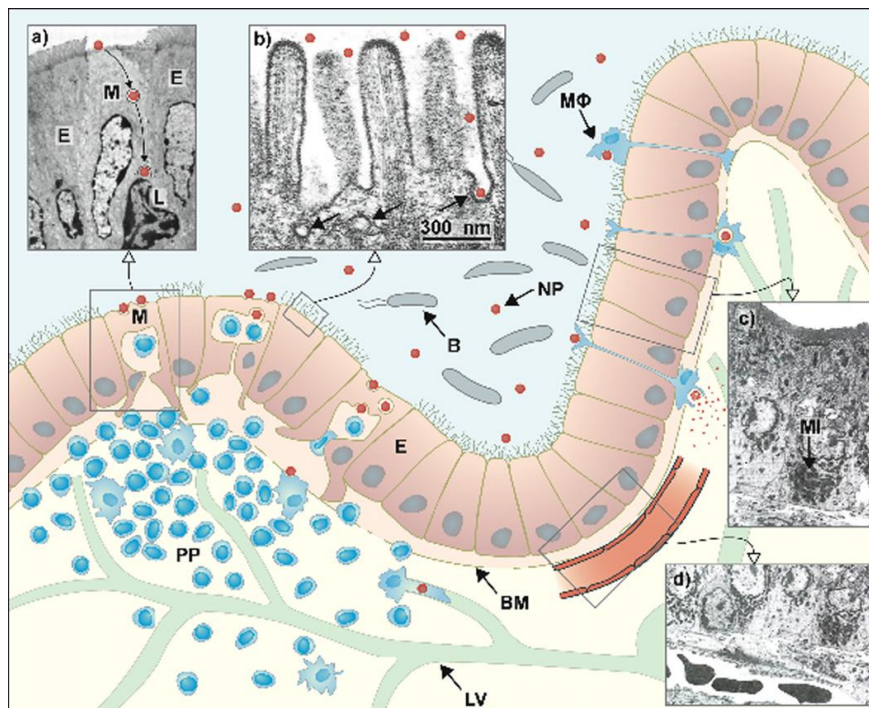
3.2 Hlavní úskalí perorální aplikace léčiv¹¹

Soubor trávicích mechanismů gastrointestinálního traktu slouží pro bezpečnou, selektivní a účinnou absorpci živin dostupných z přijímané potravy. Látky podávané ústy jsou podrobeny náročným podmínkám v prostředí žaludku, které je silně kyselé (pH 2 až 3) a obsahuje řadu enzymů zahrnující lipázy a proteázy, jejichž funkcí je započít trávení potravy a zničit patogeny či toxiny. Částečně natrávený materiál poté vstupuje do první části tenkého střeva, duodena, kde se v závislosti na přítomnosti tráveniny uvolňují pankreatické enzymy, hydrogenuhličitanový pufr a soli žlučových kyselin ze žlučových cest.

Střevní epitel je specializován k absorpci výživných součástí z potravy, ale současně vytváří překážku pro absorpci léčiv. Skládá se z absorpčních enterocytů prostoupených četnými kalíškovými buňkami produkujícími mukus, endokrinními Panethovými buňkami. Imunokompetentní buňky (B a T lymfocyty, dendritické buňky) se nacházejí pod epitelem v lamina propria a jsou vnořeny mezi enterocyty. Vyjimku představují intraepiteliální lymfocyty a dendritické buňky. Asociovaný folikulární epitel (FAE) tvoří rozhraní mezi prostředím lumen a lymfatickou tkání střevem naskládanou v Peyerových plátech, zejména v ileu.¹²

FAE obsahuje enterocyty a M-buňky, které jsou strukturálně odlišné od enterocytů. Mají méně kalíškovitých buněk produkujících sliz, méně microvilli a mají rozdíly v dominanci a typu povrchových buněčných receptorů.¹³ M-buňky hrají roli hlídačů, neustále přijímají a internalizují materiál lumen a transportují ho do podkladové lymfatické tkáně.¹⁴

Obr. 3.1. Morfologie střevních segmentů ve vztahu ke vstřebávání nanočástic¹⁵



Legenda: Enterocyty, E; Peyerovy pláty, PP (s obsahem M buněk, dendritických buněk, makrofágů a B-buněk, bakterie (B); zpracovaná nanočástice (NP). Bazální membrána (BM), krevní kapiláry a mezenterické lymfatické cévy (LV) v oblasti lamina propria.

Vnitřní rámeček (a) představuje elektron-mikroskopický snímek typické M buňky obklopené enterocyty a podkladovými lymfocyty L.

Vnitřní rámečky (b) a (c) obsahují elektron-mikroskopické fotografie enterocytů; mitochondrie MI jsou zde velmi hojné

Trávenina dále postupuje přes jejunum a ileum. V průběhu tohoto průchodu vzrůstá pH trávicího traktu z kyselého prostředí v žaludku na hodnotu 5 až 6 v duodenu až k neutrálnímu (okolo pH 7) od středu ke konci jejunu. Cestou jsou velké proteiny štěpeny na malé peptidy a dále jsou, před jejich selektivním vstřebáním ve formě aminokyselin, dipeptidů a tripeptidů, zpracovávány na povrchu buněk střevního epitelu peptidázami. Zároveň jsou v gastrointestinálním traktu prostřednictvím žlučových kyselin dispergovány lipidy.

Lipidy jsou štěpeny na volné mastné kyseliny, diglyceridy a triglyceridy a následně absorbovány. Komplex sacharidů je štěpen na monosacharidy a disacharidy, které se selektivně vstřebávají pomocí specifických přenašečů, podobně jako vitamíny

a minerály.¹⁶ Trávicí procesy jsou tedy zaměřeny na postupný rozklad komplexu živin až na jejich základní stavební jednotky a dále na jejich následné vstřebání.

Vzhledem k mnoha vlivům katabolických procesů zprostředkovaných trávicím traktem byla studována řada metod snižujících přímý kontakt nestabilních molekul s nejškodlivějšími aspekty trávicích pochodů. Cílem je vždy v podstatě umožnit průchod nestabilních léčiv žaludkem ve vhodné ochranné struktuře, uvolnit je v trávicím traktu až později a umožnit tak jejich vstřebání. Mnoho špatně absorbovatelných léčiv je nejen nestabilních, ale také poté co dosáhnou jejunu a ilea, je ani nelze snadno transportovat přes střevní epitel. Ke zlepšení jejich zachytu a zadržení v místě optimální absorpce je proto nutné hledat další vhodné metody.

3.2.1 Změny pH vyvolané onemocněním

Hodnoty pH v žaludku jsou ovlivňovány řadou patofyziologických podmínek, jakými jsou například hypochlorhydrie či achlorhydrie (snížená nebo chybějící sekrece žaludeční kyseliny) nebo hypergastrinemie (zvýšená sekrece gastrinu a $\text{pH} < 2$), což má následně vliv na rozpustnost a biologickou dostupnost slabě bazických léčiv.¹⁷ Prokázalo se, že například u pacientů s AIDS se snížila biodostupnost ketokonazolu právě v důsledku zvýšeného žaludečního pH.¹⁸ Jiná studie se zabývala vlivem achlorhydrie způsobené léky a rovněž dokázala sníženou biodostupnost ketokonazolu.¹⁹ Zajímavým faktem je, že jsme schopni zvýšit biodostupnost léčiva až o 65 % podáním látky současně s kyselým nápojem (Coca-Cola) oproti podání s vodou.²⁰

Zdá se, že pH v tenkém střevě se při Crohnově chorobě nemění.²¹ V tlustém střevě jsou ale při tomto onemocnění patrně nižší hodnoty pH (okolo 5,3).

3.2.2 Ochrana před vysoce kyselým prostředím žaludku

Jestliže drastické podmínky v žaludku, dvanácterníku a přední části lačníku nepoškodí léčivo kompletně, může jeho částečná destrukce nebo přeměna vést k příliš nízké koncentraci. Pravděpodobnost poškození léčiva se zvyšuje, jestliže látka setrvává v žaludku po delší dobu, což může být způsobeno stravou nebo individuálními podmínkami v této části gastrointestinálního traktu.

Jeden z možných způsobů řešení této situace spočívá v izolaci léčiva před škodlivým prostředím trávicího traktu. Dobře známou a kompletně vyvinutou technologií

je potahování kapslí a tablet pomocí polymerů, které jsou stabilní v nízkém pH žaludku a rozpustné jsou až v neutrálnějším pH prostředí konce jejunu a v ileu.

Příkladem materiálů stabilních v kyselém prostředí, které se využívají k potahování tobolek a tablet pro ochranu léčivé látky před nízkým pH a enzymatickou zátěží v žaludku a proximální části tenkého střeva, jsou polymethakryláty. Při přípravě amorfních pevných disperzí systému léčivo/polymer s dobrou stabilitou léčiva ve zkušebních podmínkách žaludku a vlastnostmi umožňujícími uvolnění léčiva v tlustém střevě byla například použita technologie hot-melt extruze využívající polymethakryláty (např. Eudragit 4155 F) a polyvinylpyrrolidony.²²

S příslibem dobré biokompatibility byla jako filmotvorný prostředek vázaný vodíkovými vazbami zkoumána směs tanninu v kombinaci s poly-N-isopropylamidem a poly2-isopropyl-2-oxazolinem.²³

Byly popsány také pevné nanočástice uvolňující léčivo závisle na pH, které byly připravené za použití hydroxypropyl- β -cyklodextrinu a/nebo Eudragitu[®] L 100. Hodnocení kationových lipozómů potažených pH citlivým aniontovým polymerem Eudragitem[®] ukazuje na možnost použití těchto materiálů k přenosu látek do distálních částí tenkého střeva i do střeva tlustého.²⁴ Bylo popsáno využití enterosolventních mikročástic pro perorální aplikaci využívající v/o/v evaporační techniku a jako polymer citlivý na pH acetát-ftalát celulosu nebo kopolymer kyseliny polymethylmethakrylát-akrylové vždy s různým množstvím polyvinylalkoholu jako stabilizátoru emulze.²⁵

3.2.3 Zlepšení stability léčiva v gastrointestinálním traktu

Bezpečný průchod nestabilních účinných látek prostředím s nízkým pH v žaludku a duodenu nezajišťuje jejich stabilitu při další intenzivní enzymatické zátěži v tenkém střevě. Jeden z přístupů spočívá v ochraně nestabilních látek před tím, než dosáhnou slizničního povrchu. Ochranná matrice obvykle nebývá v nanorozměrech. Například biokompatibilní polymer jako ethylcelulóza může být použit k produkci přípravků s prodlouženým uvolňováním po perorální aplikaci ve formě mikrokapslí. Podobně lze využít hydrogel složený z kyseliny metakrylové a polyethylenglykolu, uvolňující léčivo kinetikou nultého řádu. Mikročástice mohou být rovněž produkovány sprejovou technologií.

Mikročástice tvořené alginátem a chitosanem obsahující bioléčivo byly připraveny sprejovým sušením vodného roztoku léčiva a alginátu a dalším síťováním

s ionty Ca^{2+} a chitosanem. Tyto částice chrání inkorporované biofarmaceutikum, dokud nejsou vstřebány M buňkami v Peyerových plátech a v enterocytech.^{26,27}

Všechny využívané pomocné látky musí být prověřeny podle řady kritérií k posouzení čistoty, stability, rozsahu systémové expozice, biodistribuce, eliminace a podobně. Pomocné látky pro orální lékové formy jsou běžně vybírány ze seznamu látek, které mají dlouhou historii v perorálním podávání a jsou obecně považované jako bezpečné. Některé nově studované pomocné látky ke stabilizaci nedostatečně stabilních léčiv spadají do tohoto seznamu, jiné nikoli. Ovšem také látky, které jsou považovány za bezpečné, mohou potřebovat další prověřování v případě, že jsou cíleny do částí organismu, kterých běžně nedosahují.²⁸

Příkladem může být želatina, která by mohla být považována za bezpečnou, jelikož je značnou mírou obsažena v naší stravě a je rozkládána v horní části trávicího traktu. Používá se také běžně jako materiál pro výrobu tobolek. Při použití želatiny jako pomocné látky v léčivém přípravku pro perorální podání, který se otevírá v tlustém střevě, se může nestrávená želatina dostat do takové části trávicího traktu, která je zcela jiná než by odpovídalo běžnému osudu želatiny jako složky potravy. Zde musí být uvaženo potenciální působení této jinak bezpečné látky na bakteriální flóru střeva, stejně jako potenciální vstřebání želatiny do systémové cirkulace.

3.2.4 Zlepšení rozpustnosti léčiva v horní části trávicího traktu

V jiných případech je příčinou nízké biodostupnosti léčiva spíše nízká rozpustnost látky než nedostatečná stabilita. Absorpční osud lipofilních látek je ovlivněn vstupem do lymfatických kapilár střevních klků, které ústí do lymfatických kanálků před vstupem do systémové cirkulace. Lymfatická cesta vstupu umožní látkám vyhnout se first-pass efektu, kterému jinak mohou být podrobena léčiva absorbovaná přes portální žilní systém. Lipozómy jako logická volba pro přenos lipofilních léčiv byly první nanočástice zkoumané ve spojení s perorální cestou podání léčiv. Nestabilita lipozomů v trávicím traktu je naneštěstí zásadní komplikací této jejich aplikace.

Špatně rozpustné sloučeniny rozpoznané při výzkumu léčiv již dnes nejsou okamžitě likvidovány, ale hledají se způsoby, které by problémy spojené s podáním těchto látek řešily. Některé z těchto snah se soustřeďují na způsoby zvýšení biodostupnosti a snížení nestálosti, která se těchto často týká společně. Detailní pochopení fyziologických funkcí vstřebávání lymfatickými cestami a metabolismu je také

rozhodující pro úspěšnou tvorbu lipofilních léčiv a proléčiv, které mohou zvýšit lymfatickou absorpci.²⁹

Byly popsány multičásticové systémy složené z α -cyklodextrinu a sojového oleje jako přenašeče lipofilních látek pro perorální podání. Cílem využití takového systému může být rovněž vstřebání lymfatickým systémem.

Některé nanomateriály, například porózní silikonové částice, zlepšují rozpustnost špatně rozpustných látek tak, že působí jako prostředek ke zlepšení vstřebání po perorálním podání. V tomto případě částice sama neprochází přes epiteliální bariéru, ale zvyšuje průnik vloženého málo rozpustného léčiva.³⁰

Nanostrukturní lipidové přenašeče jsou vytvářeny vysokotlakou homogenizací. Může na ně být navázáno až 30 % léčiva a přinesly zlepšení například při vstřebávání undekanoátu po perorálním podání. Schopnost lipozómů usnadnit přenos hydrofilních makromolekul přes polarizované epiteliální bariéry může být vylepšena například inkorporací cetylpyridinium chloridu.³¹

Kombinace těchto metodik mohou poskytnout nové přístupy k usnadnění průchodu takových perorálně aplikovaných špatně rozpustných léčiv, pro které dříve nebylo možno tuto cestu využít.

3.2.5 Využití nanostruktur v lékových formách k perorálnímu podání

Jednou z cest ke zlepšení perorálního podání léčiv je využití nanostrukturních nosičů. Jedná se přitom například o ochranu nestabilních látek před jejich přímým kontaktem s epiteliálním povrchem střeva. Některé studie na zvířatech navíc naznačují, že se nanostrukturní soustavy mohou ze střevního lumen také vstřebávat a tak mohou napomáhat při podávání jinak špatně vstřebatelných léčiv. Tyto studie ukázaly, že léčiva inkorporovaná do nanostruktur mají lepší biologickou dostupnost po perorální aplikaci než roztok téže látky. V neposlední řadě se od nanostruktur očekává, že umožní lepší distribuci léčiva na povrchu střevního epitelu a tím zlepši vstřebávání a absorpční profil léčiva.

V poslední době byla popsána řada nových přístupů při výrobě nanomateriálů používaných k podávání nestabilních molekul. K nim patří využití rostlinného polysacharidu mannanu. Nanogely vytvořené za použití amfifilní formy mannanu mohou spontánně inkorporovat proteiny a další látky a potenciálně poskytovat nový typ soustavy pro perorální podání různých léčiv.³² Mechanismy, kterými tyto systémy usnadňují

například vstřebání inzulinu po perorálním podání, se zdají být komplexní. Zapojuje se zřejmě jak aktivní transport tak i reverzibilní otevření těsných mezibuněčných spojení.

Nanočástice samy o sobě nemívají při kontaktu s povrchem epitelálních střevních buněk sklon k vstřebávání. Není proto překvapující, že poslední studie s nanočásticemi tvořené hydroxypropyl- β -cyklodextrinem jako látky schopné modifikovat funkce epitelálních bariér prokázaly schopnost zlepšeného průchodu přes sliznici tlustého střeva u prasat.³³

Matrice z vláken hedvábí jsou biokompatibilní, podléhají pomalé biodegradaci a disponují vynikajícími mechanickými vlastnostmi. Byly navrženy jako další možný materiál využitelný pro perorální cestu podání. Poslední výzkumy se věnovaly i potenciálnímu užití matric z hedvábných vláken ke zlepšení vlastností mikročástic a nanočástic jako nosičů i jako materiálu pro obalování.

U některých nanočástic byla popsána schopnost zacílit se po vstřebání sliznicí na vybraná místa v těle. Studie posledních let pracující se zlatými nanočásticemi ukazují, jak velikost částice a její povrchové vlastnosti mohou ovlivňovat povahu a rozsah tkáňové distribuce po perorálním podání.

Problém s využitím nanočástic zahrnujícím inkorporaci účinné látky spočívá v tom, že některé technologické postupy přípravy nanočástic mohou nestabilní léčiva poškodit. Proto se hledají postupy využívající šetrných podmínek. Například byly použity kombinace dvou různých metod: hydrofobní ion-párové enkapsulace následované komplexací zahrnující polyakrylovou kyselinu a detergent. S využitím leuprolidu bylo prokázáno, že takto připravené částice mohou zvyšovat perorální biodostupnost některých citlivějších látek.³⁴

Přesto však stále existuje spousta nejasností týkajících se výroby, chování, osudu a bezpečnosti nanočástic užívaných pro perorální podání léčiv. Úspěšná klinická aplikace vyžaduje adaptaci příslušné nanotechnologie pro vhodné léčivo ve vhodné indikaci. Slibnou kombinaci možná odhalila studie zabývající se nanočásticemi zprostředkovaným perorálním podáním cyklosporinu.

3.2.6 Zvýšení přilnavosti orálních lékových forem ke sliznici

K vylepšení způsobů, které přinesou nestabilní, případně špatně rozpustné léčivo až k epitelálnímu povrchu, kde se s větší pravděpodobností absorbují poté, co byly uvolněny do střevního lumen, jsou studovány různé druhy mukoadhezivních materiálů.

Smyslem tohoto přístupu je zlepšit absorpci perorálně podávaných nestabilních a špatně rozpustných léčiv jejich přivedením prostřednictvím ochranných přenašečů do těsné blízkosti střevní sliznice, aby uvolňované léčivo mohlo dosáhnout povrchu epitelálních buněk ještě před svým zničením ve střevním lumen.

Tomuto účelu mohou pomáhat nosiče s mukoadhezivními vlastnostmi. Významné pokroky v bioadhezivních strategiích pro bukální podání poskytly důležité zásady a principy, které lze využít také pro zvýšení přilnavosti materiálů na slizniční povrch tenkého a tlustého střeva. V tomto smyslu bylo zjištěno, že β -dextrin má stejně významné mukoadhezivní vlastnosti jako karbopoly a lepší než chitosan.

Pro perorální podávání léčiv je chitosan významným polymerem kvůli jeho jedinečným vlastnostem, bezpečnosti a dostupnosti. Chitosanové nanokapsle například poskytují slibné výsledky jako nosiče pro perorální podání peptidů. Nedávná studie našla a popsala vliv molekulové hmotnosti a stupně acetylace na tvorbu a vlastnosti chitosanových nanokapslí.³⁵ Také nanočástice vytvořené z thiolovaného chitosanu mají mukoadhezivní vlastnosti, které mohou usnadnit přenos nestabilních léčiv. Podobně konjugace s merkaptonikotinovou kyselinou může poskytnout částice se silnými mukoadhezivními vlastnostmi, díky kterým jsou zajímavé jako nosiče pro perorální podání peptidických léčiv.³⁶ Inkorporace cyklodextrinů do polyanhydridových nanočástic poskytla žádoucí bioadhezivní vlastnosti pro lipofilní léčivo a zlepšila tak výsledky jeho perorálního podání.

Další způsob využití přilnavosti perorálně podávaných léčiv ke slizničnímu povrchu spočívá v umístění léčiva na náplast připravenou klasickou mikrovláknou technikou a jejím perorálním podáním.³⁷

3.2.7 Zvýšení biologické dostupnosti špatně vstřebatelných léčiv

Proteiny, které nejsou tělu vlastní, nemohou do našeho těla volně procházet a rozkládat se na stavební jednotky, které by vyvolaly rozsáhlou imunitní odpověď. Bariéra tvořená střevními epitelálními buňkami omezuje vstřebávání proteinů do té doby, dokud tyto složky potravy nejsou zmenšeny až na struktury natolik malé, že nemají schopnost navázat na proteiny hlavního histokompatibilního komplexu zapojené do prezentace antigenu.

Navzdory již známým způsobům ochrany léčiv při průchodu žaludkem a předními úseky tenkého střeva a při jeho přenosu k apikálnímu povrchu epiteliálních buněk v jejunu a ileu, se řada bioterapeutik nemůže v distálních částech střeva dostatečně vstřebávat, dokud nejsou lokálně dostatečně dobře natrávena. Tento problém byl důkladně studován a v současnosti je testována řada metod jak dosáhnout zlepšení epiteliální propustnosti transcelulární nebo paracelulární cestou. Ke zlepšení biodostupnosti se v současné době využívají látky spadající do různých chemických skupin: detergenty, mastné kyseliny, nové aminokyseliny, komplexy lipidů a další.

Jako nejúspěšnější se ukázali zástupci vybraní ze seznamu látek obecně považovaných za bezpečné (GRAS). Jelikož však mnoho špatně absorbovatelných léčiv může být poškozeno také vysokými koncentracemi látek GRAS, je důležité zvolit takové pomocné látky, které neohroží stabilitu léčiv.

Byly zkoumány cesty, jak vylepšit nízkou biologickou dostupnost. Nanočástice obsahující lososí kalcitonin mohou být připraveny spojením peptidu s kationovým amfifilním polyelektrolytem polyallylaminem s palmitoylem a kvarterními amoniovými skupinami.³⁸

Látka zlepšující propustnost N-[8-(-hydroxybenzoyl)amino] kaprylát může zvýšit biodostupnost biologicky aktivního glukagon-like peptidu 1 po orálním podání u zdravých dospělých jedinců.

Užití těchto pomocných látek tedy může zlepšit výsledky perorálního podání špatně vstřebatelných látek, jestliže se udrží dostatečně stabilní ve střevním lumen. V některých případech kompletní strategie úspěšného perorálního podání zahrnuje podání nestabilního léčiva společně s látkami, které inhibují destruktivní účinky enzymů a látkami usnadňujícími absorpci. Tento přístup byl popsán pro podání inzulínu společně s inhibitorem proteáz camostat mesilátem a látkou podporující absorpci, konkrétně glykocholátem sodným.

Byly popsány také způsoby stabilizace, ochrany a přenosu nestabilních látek přímo lokálně do střeva, protože důležitým cílem terapie mohou být i různé buňky trávicího traktu samotného. Takový případ popisuje studie používající porézní silikonové nanočástice aplikační soustavy pro cílenou inhibici signalizačních kmenových buněk.

Jednou z dalších možností je kovalentní modifikace léčebného proteinu s glykosylfosfatidylinositolem umožňující přenos léčiva z této struktury k membráně cílových buněk. Tato úprava může rovněž napomoci přenosu terapeutického proteinu přes intestinální bariéru do systémové cirkulace.³⁹

3.2.8 Výhledy optimalizace perorálního podání léčiv

Výzkum v dané oblasti se zaměřuje na řešení problémů spojených se stabilizací léčiv a nalezení způsobů zlepšení biologické dostupnosti špatně absorbovatelných látek po perorálním podání. K nim v posledních letech patří také využití nanovláknenných membrán. Klinický význam těchto prací vzroste, až bude dostatečně prozkoumán a znám dobře definovaný koncept liberace, absorpce a biodistribuce pro podání léčiv.

Personalizovaná terapie je takový model léčení, který přizpůsobuje zdravotní péči, včetně všech rozhodnutí a výkonů, na míru každému individuálnímu pacientovi s použitím genetických a jiných informací. Tento způsob se již několik let zvažuje jako optimální cesta léčení pacientů. Realizace takového konceptu přináší řadu problémů. Jeden z takových problémů řeší výzkum zkoumající realizovatelnost pevných aplikačních systémů, které by umožnily flexibilní dávkování, jako je třeba pero uvolňující vhodnou dávku léčiva nebo film nesoucí léčivo, který lze rozdělovat na individuálně velké části, vhodný pro podání ústy. Soustavy jsou vyvinuty tak, aby umožnily úpravu dávky vhodným rozdělením monolitického nosiče léčiva.⁴⁰

Pochopení povahy a charakteristik uvolňování účinných látek z lékových forem pro perorální podávání léčiv je nezbytné ke vhodnému užití těchto systémů nejen v této aplikaci, ale také k potenciálnímu využití pro jiné aplikace. Byly již popsány potřebné matematické modely znázorňující uvolňování léčiva a jeho absorpci *in vivo*. Podobně byly také provedeny simulace, které zahrnují tlak vyvíjený motilitou gastrointestinálního traktu, smykové napětí vznikající během postupu v některých úsecích trávicího systému a krátkodobý kontakt se střevními tekutinami z důvodu občasného setkání se střevními vzduchovými kapsami.⁴¹

Dále je také snahou lépe pochopit osud lékových forem pro perorální aplikaci po jejich podání do organismu. Výzkumníci stanovují neinvazivní metody pro posuzování těchto hodnocení. Patří sem například scintigrafie či magnetická rezonance.

Léčba ulcerózní kolitidy může být mnohem efektivnější za předpokladu, že se léčivo dostane přímo do tlustého střeva. Farmakoscintigrafický průzkum u zdravých dobrovolníků za použití MMX Multi Matrix System[®]) k přenesení propyonyl-L-karnitinu, přirozeně se vyskytujícího analoga L-karnitinu, dokázal, že hlavním místem uvolnění látky a její absorpce je tlusté střevo.⁴²

Téma, které se často neřeší dostatečně včas při tvorbě systému k perorálnímu podání léčiv, je problém dopadu, jaký mohou mít konkrétní použité látky na střevní mikroflóru v gastrointestinálním traktu. Například studie využívající Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) ke studiu vlivu různého množství polyethylenvinylacetátu na ekosystém trávicího traktu po perorálním podání může předvídat a potenciálně snížit drahé formulační změny v pozdějších fázích výzkumu.⁴³

Po vstřebání nanočástic s účinnou látkou do krve jsou základními parametry chemické a fyzikální vlastnosti nanočástic tím, co ovlivňuje farmakokinetiku a distribuci léčiva v organismu. Faktory, které mají na farmakokinetiku vliv, byly přezkoumány poměrně nedávno.⁴⁴ Patří k nim povrchová úprava s využitím polyethylenglykolů, aby se zabránilo interakci s retikulo-endoteliálním systémem a dosáhlo prodloužení oběhu a poločasu rozpadu, a tím dále lepší difúzi tkáněmi, účinná je také neutralizace náboje částic. To, zda se účinná látka vstřebává sama o sobě nebo zapouzdřená, je zásadním parametrem. Ve srovnání s vysokým množstvím in vitro studií popsaných v literatuře, je perorální podání peptidů, proteinů nebo očkovacích látek pomocí polymerních nanočástic in vivo dosud popsáno mnohem méně.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny

Methanol pro HPLC	Sigma-Aldrich, Praha
Kyselina mravenčí (p.a.)	Penta, Praha
Dihydrogenfosforečnan sodný (ČL 2012)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydrogenfosforečnan sodný (ČL 2012)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydroxid sodný (čistý)	Penta, Praha
Voda na injekci (ČL 2005)	Ardeapharma, Ševětín
Čištěná voda (ČL 2005)	FAF UK, Hradec Králové
Voda pro HPLC ultračistá	FAF UK, Hradec Králové

Všechny suroviny byly podle deklarací výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravy na FAF UK a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

4.2 Přístroje

Analytické váhy Sartorius 2004MP	Sartorius GmbH, Německo
Analytické váhy Kern 440-45N	Kern Sohn GmbH, Německo
Digitální pH metr Gryf 209 L	Gryf HB s.r.o., Česká republika
Elektronická míchačka Variomag	Labortechnik, Německo
Vodní lázeň, Grant JB5	Grant Instruments, Velká Británie
Termostat BT50	Labor. přístroje, Česká republika
Magnetické míchadlo, Telesystem	H-P Labortechnik, Německo
Sestava HPLC Agilent Techn.1200,	Agilent Technologies, USA
<ul style="list-style-type: none">- Isokratické čerpadlo: Iso Pump G1310A- UV/VIS detektor: VWD G1414B s proměnnou vlnovou délkou- Kolony: Zorbax Eclipse plus C18, oktadecylsilanový sorbent, průměr 4,6mm, délka 150mm, zrnitost 5mikrometrů- Software: ChemStation	

4.3 Testované membrány

V liberačních pokusech byly testovány membrány tvořené směsí tří polymerů. Jedná se o kombinaci hydroxypropylcelulózy (HPC), polyethylenoxidu (PEO) a polyvinylalkoholu (PVA). Pracovala jsem s membránami o třech koncentracích diaminu, jehož uvolňování jsem sledovala. Membrány byly podle obsahu účinné látky pro snadnější orientaci označeny výrobcem jako 20%, 30% a 40%. Skutečný obsah diaminu pro testované membrány:

HPC/PEO/PVA	20%	odpovídá	16,67%
HPC/PEO/PVA	30%	odpovídá	23,08%
HPC/PEO/PVA	40%	odpovídá	28,57%

Kromě koncentrace účinné látky se membrány lišily gramáží (plošnou hmotností) a další technologickou charakteristikou, vyjádřenou a kvantitativně označenou jedním z čísel 1, 2 a 3. Od každé membrány s danou koncentrací léčivé látky byly protestování k dispozici 3 vzorky s odlišnou technologickou charakteristikou. Celkem tedy bylo k dispozici celkem 9 odlišných vzorků membrán, z nichž každý byl testován ve 4 současně prováděných paralelních měřeních liberačních vlastností.

V kódování membrán v protokolech jsou tyto skutečnosti vyjádřeny tak, že například v čísle 20.3.2 značí první číslo (20) koncentraci, druhé číslo (3) značí technologický postup, třetí číslo (2) znamená pořadové číslo dílčího paralelního vzorku.

4.4 Provedení liberačních experimentů

4.4.1 Pilotní liberační pokusy

Záměrem první série liberačních pokusů bylo především ujistit se o správném technickém provedení experimentu, o správné volbě jednotlivých parametrů experimentálního uspořádání. V prvním kroku jsme zvolili jako vhodný rozměr membrány ústřížek o velikosti 2,0 cm². V dalších krocích jsme rozhodli o zkoušení 4 ústřížků z každého ze tří různých archů membrány (1, 2 a 3) o stejné koncentraci nanesené účinné látky avšak s mírně odlišnou gramáží (v rámci vzorků o stejné koncentraci).

Každý liberační pokus byl tedy proveden s 12 vzorky od každé membrány. Při odebrání zvolených ústřížků bylo třeba pracovat v rukavicích, s pinzetou a přesnou hmotnost každého vzorku stanovovat na analytických vahách.

4.4.2 Vlastní liberační pokusy

Liberační stanovení probíhala pro každou membránu s odlišnou koncentrací účinné látky zvlášť, postup byl ovšem pro všechny tři pokusy stejný. Před samotným sledováním liberace bylo třeba připravit a vhodně označit všechny pomůcky. Za použití rukavic, nůžek a pinzety jsem z každého ze tří archů membrány oddělila 4 ústřížky o přibližné velikosti 2,0 cm² a pomocí analytických vah zjistila a zaznamenala přesnou hmotnost každého z nich. Vzorky jsem vložila každý zvlášť do předem označené vialky o objemu 10 ml a přidala magnetické míchadlo vhodné velikosti.

Vlastní liberační stanovení bylo zahájeno v okamžiku přidání 10 ml fosforečnanového pufru o pH 7,4 do každé z 12 vialek se vzorkem membrány a jejich následným umístěním na ponornou magnetickou míchačku do vodní lázně vytemperované na 37°C. Vkládání vialek a zahájení pokusu pro každý z 12 vzorků jsem prováděla podle předem sestaveného časového schématu, aby bylo prakticky možné odebírat vzorky ze všech vialek přesně po uplynutí stanoveného času.

První odběr roztoku vzorku jsem provedla po 5 minutách liberace. Do předem připravených vialek jsem z každého vzorku pipetou odebrala 9 ml a objem vialek s membránou ve vodní lázni doplnila pufrem zpět na 10 ml. Vzorek jsem tedy zředila desetkrát. Odběr jsem prováděla s nejvyšší opatrností, aby nedošlo k nasátí membrány do pipety a neovlivnila se tedy přesnost stanovení. Následně jsem z každých odebraných devíti mililitrů přenesla 0,5 ml vzorku do 12 připravených vialek o objemu 2 ml.

Další odběry jsem prováděla po 10, 15, 30 a 60 minutách od zahájení experimentu. Z každé vialky ve vodní lázni jsem vždy v určeném čase pomocí automatické pipety odebrala 0,5 ml vzorku a přenesla jej do nachystaných 2ml vialek označených číslem vzorku a dobou liberace. Vialky, ve kterých probíhala liberace, jsem vždy ihned doplnila umělou střešní šťávou (pH 7,4) na původní objem.

Po posledním odběru, v čase 60 minut od zahájení pokusu, jsem tedy od každého z dvanácti kousků membrány získala pět odběrů 0,5 ml akceptorového roztoku, který vždy obsahoval určité množství uvolněné látky v závislosti na době liberace. Do všech 60

vialek obsahujících 0,5 ml pufru s uvolněnou účinnou látkou jsem přidala 0,5 ml 0,1M roztoku hydroxidu sodného ($f = 0,018$).

Provedení pokusu bylo stejné pro membránu s obsahem 20%, 30% i 40% diaminu a všechny tři technologicky rozdílné verze 1. 2. a 3. Od každé membrány stejné koncentrace tedy bylo testováno celkem 12 vzorků.

4.4.3 Zpracování experimentálních dat

Výsledky HPLC stanovení byly naměřeny Mgr. Pavlem Berkou a Mgr. Petrem Vrbatou (katedra farmaceutické technologie), kteří je z programu ChemStation k převedli do aplikace Excel. Další zpracování ve speciální šabloně, která je k tomuto účelu na katedře k dispozici, jsem prováděla samostatně.

V části **5. Dokumenty** jsou v 36 protokolech shrnuty podstatné informace z jednotlivých dílčích liberačních pokusů. Hodnoty z měření HPLC odpovídají nekorigovaným koncentracím c_{nk} , které byly pomocí programu převedeny na korigovanou koncentraci c_k , která zohledňuje průběžný odběr vzorků, doplňování akceptorové fáze i její objem na počátku pokusu V_0 . Následně jsou vždy vypočteny hodnoty Q_t , tedy množství diaminu, uvolněná z membrány do akceptorové fáze) a Q_t (teor), což jsou množství léčiva odečtená z regresní křivky.

4.4.4 Vysvětlivky k protokolům

c_{nk} nekorigovaná koncentrace

c_n koncentrace korigovaná na průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze

Q_t , $Q_{t(exp)}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] skutečné množství látky, které se uvolní membránou o ploše 1cm^2 do akceptorové fáze

Q_t [μg] ... skutečné množství látky, které se uvolní membránou do akceptorové fáze

$Q_{t(teor)}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] množství látky, které se uvolní membránou o ploše 1cm^2 do akceptorové fáze a odečtené z regresní křivky

Dílčím výsledkem je grafické vyjádření průběhu liberace, pro které bylo využito proložení logaritmickou křivkou. Pro získání hodnot fluxu J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] léčiva byl vybrán pouze počáteční přímkový průběh liberačního profilu.

5 DOKUMENTACE

Protokol 1: Liberace z membrány 1 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.1.1
----------	--------

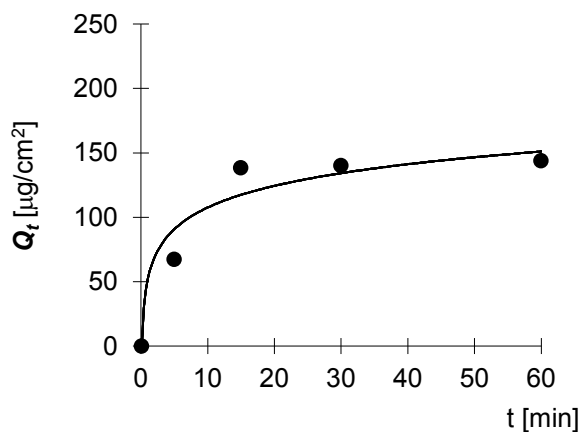
Hmotnost	6710 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	13,432	9	13,432	134,3	67,2
15	15,556	0,5	27,645	276,4	138,2
30	15,150	0,5	28,017	280,2	140,1
60	15,152	0,5	28,776	287,8	143,9

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	67,2	65,2
15	138,2	84,4
30	140,1	113,2
60	143,9	170,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,92$
Abs. člen	$q = 55,55$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 2: Liberace z membrány 1 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.1.2
----------	--------

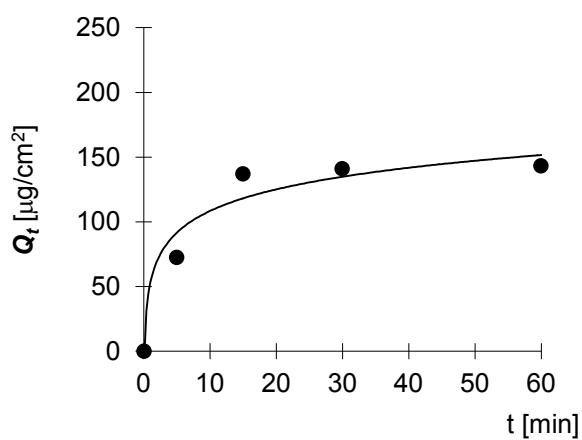
Hmotnost	5950 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	14,492	9	14,492	144,9	72,5
15	14,326	0,5	27,369	273,7	136,8
30	14,420	0,5	28,179	281,8	140,9
60	14,154	0,5	28,634	286,3	143,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	72,5	72,5
15	136,8	136,8
30	140,9	140,9
60	143,2	143,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,88$
Abs. člen	$q = 57,32$
Korelační koef.	$r = 0,72$



Protokol 3: Liberace z membrány 1 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.1.3
----------	--------

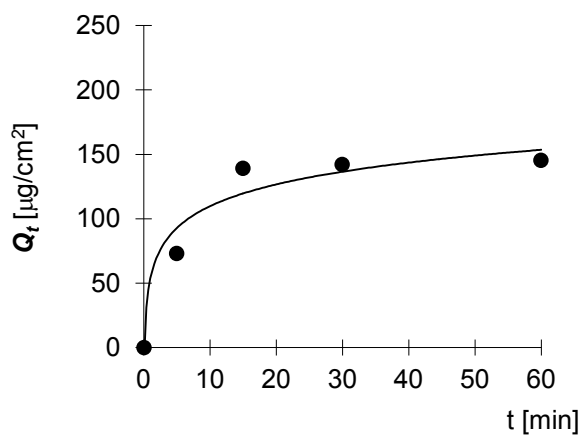
Hmotnost	7850 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	14,616	9	14,616	146,2	73,1
15	14,642	0,5	27,796	278,0	139,0
30	14,530	0,5	28,417	284,2	142,1
60	14,466	0,5	29,079	290,8	145,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	73,1	67,4
15	139,0	86,5
30	142,1	115,1
60	145,4	172,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,91$
Abs. člen	$q = 57,90$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 4: : Liberace z membrány 1 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.1.4
----------	--------

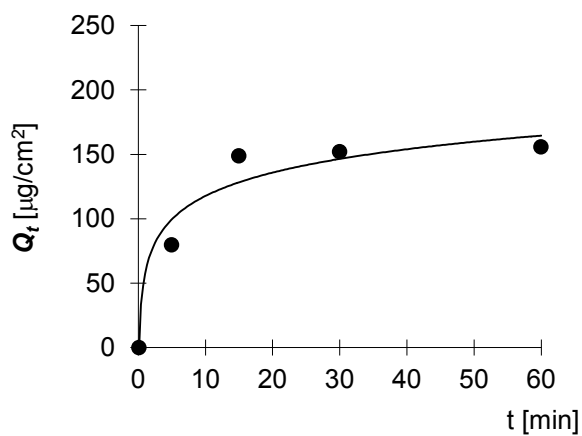
Hmotnost	7080 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	15,920	9	15,920	159,2	79,6
15	15,414	0,5	29,742	297,4	148,7
30	15,308	0,5	30,407	304,1	152,0
60	15,282	0,5	31,146	311,5	155,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	79,6	72,6
15	148,7	92,9
30	152,0	123,4
60	155,7	184,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 2,03$
Abs. člen	$q = 62,44$
Korelační koef.	$r = 0,72$



Protokol 5: Liberace z membrány 2 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.2.1
----------	--------

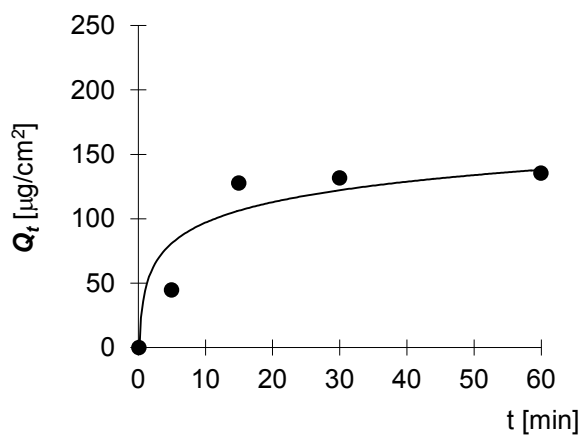
Hmotnost	7560 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	8,923	9	8,923	89,2	44,6
15	17,506	0,5	25,537	255,4	127,7
30	17,400	0,5	26,306	263,1	131,5
60	17,268	0,5	27,044	270,4	135,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	44,6	54,7
15	127,7	74,1
30	131,5	103,4
60	135,2	161,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,95$
Abs. člen	$q = 44,92$
Korelační koef.	$r = 0,76$



Protokol 6: Liberace z membrány 2 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.2.2
----------	--------

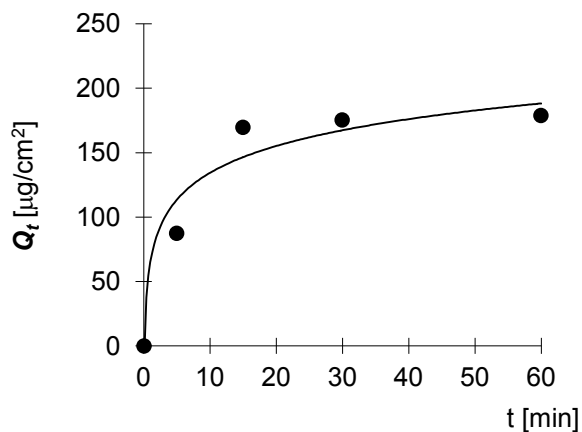
Hmotnost	9230 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	17,454	9	17,454	174,5	87,3
15	18,234	0,5	33,943	339,4	169,7
30	18,470	0,5	35,090	350,9	175,5
60	18,220	0,5	35,764	357,6	178,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	87,3	81,9
15	169,7	105,6
30	175,5	141,2
60	178,8	212,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 2,37$
Abs. člen	$q = 70,03$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 7: Liberace z membrány 2 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.2.3
----------	--------

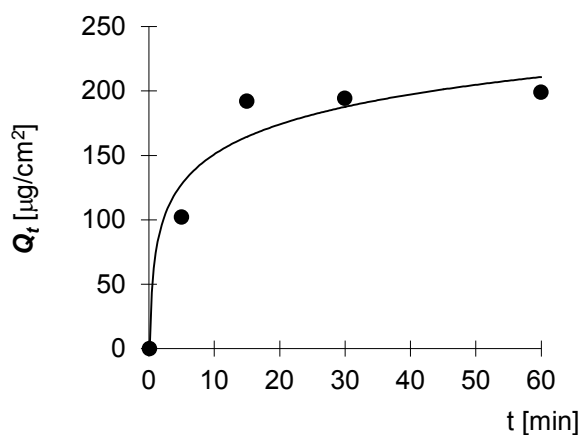
Hmotnost	7590 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	20,410	9	20,410	204,1	102,1
15	20,038	0,5	38,407	384,1	192,0
30	19,480	0,5	38,851	388,5	194,3
60	19,466	0,5	39,811	398,1	199,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	102,1	93,4
15	192,0	119,3
30	194,3	158,2
60	199,1	235,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 2,59$
Abs. člen	$q = 80,43$
Korelační koef.	$r = 0,72$



Protokol 8: Liberace z membrány 2 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.2.4
----------	--------

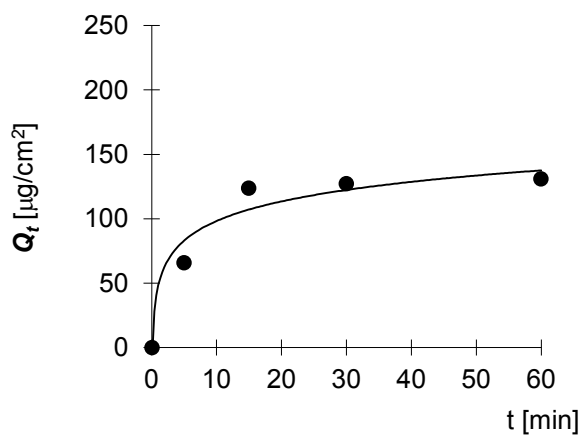
Hmotnost	6220 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	13,154	9	13,154	131,5	65,8
15	12,890	0,5	24,729	247,3	123,6
30	12,948	0,5	25,431	254,3	127,2
60	13,042	0,5	26,173	261,7	130,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	65,8	60,2
15	123,6	77,4
30	127,2	103,2
60	130,9	154,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,72$
Abs. člen	$q = 51,64$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 9: Liberace z membrány 3 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.3.1
----------	--------

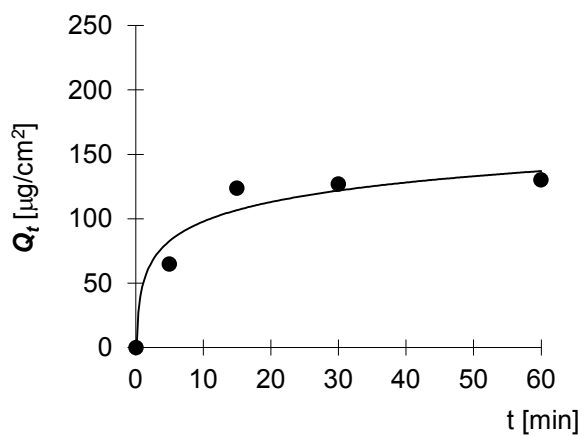
Hmotnost	6130 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	12,936	9	12,936	129,4	64,7
15	13,074	0,5	24,716	247,2	123,6
30	13,100	0,5	25,396	254,0	127,0
60	13,080	0,5	26,031	260,3	130,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	64,7	59,9
15	123,6	77,0
30	127,0	102,8
60	130,2	154,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,71$
Abs. člen	$q = 51,32$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 10: Liberace z membrány 3 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.3.2
----------	--------

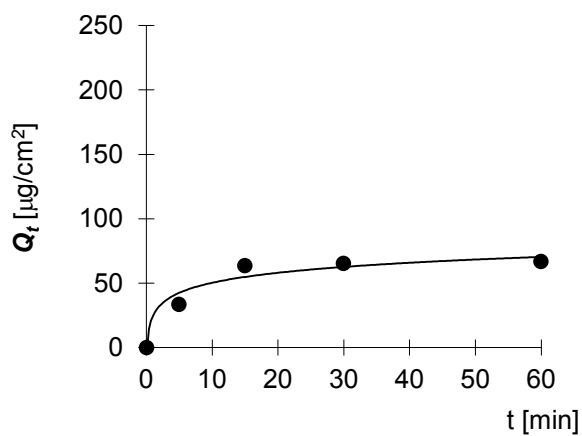
Hmotnost	7720 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	6,692	9	6,692	66,9	33,5
15	6,703	0,5	12,726	127,3	63,6
30	6,678	0,5	13,036	130,4	65,2
60	6,660	0,5	13,352	133,5	66,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	33,5	30,9
15	63,6	39,6
30	65,2	52,8
60	66,8	79,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,88$
Abs. člen	$q = 26,49$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 11: Liberace z membrány 3 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.3.3
----------	--------

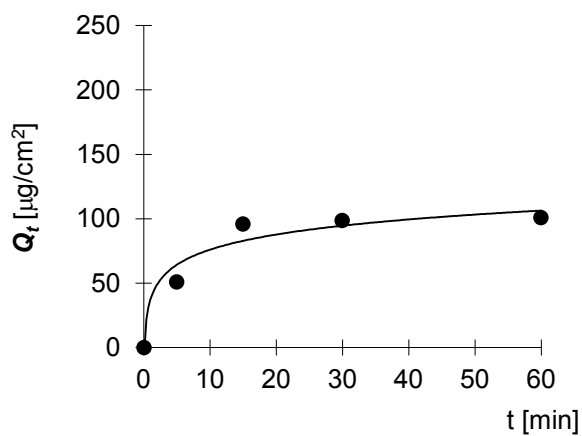
Hmotnost	9370 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	10,187	9	10,187	101,9	50,9
15	9,986	0,5	19,154	191,5	95,8
30	10,025	0,5	19,693	196,9	98,5
60	10,009	0,5	20,178	201,8	100,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	50,9	46,7
15	95,8	59,9
30	98,5	79,8
60	100,9	119,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,32$
Abs. člen	$q = 40,07$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 12: Liberace z membrány 3 s obsahem 20 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	20.3.4
----------	--------

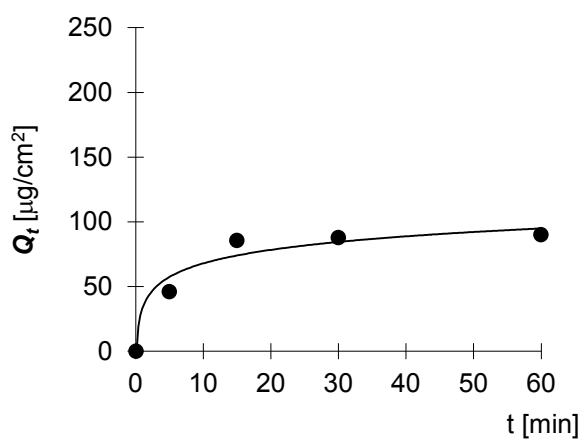
Hmotnost	7250 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	9,194	9	9,194	91,9	46,0
15	8,821	0,5	17,096	171,0	85,5
30	8,817	0,5	17,533	175,3	87,7
60	8,838	0,5	17,995	179,9	90,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	46,0	41,8
15	85,5	53,6
30	87,7	71,2
60	90,0	106,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,18$
Abs. člen	$q = 35,93$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 13: Liberace z membrány 1 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.1.1
----------	--------

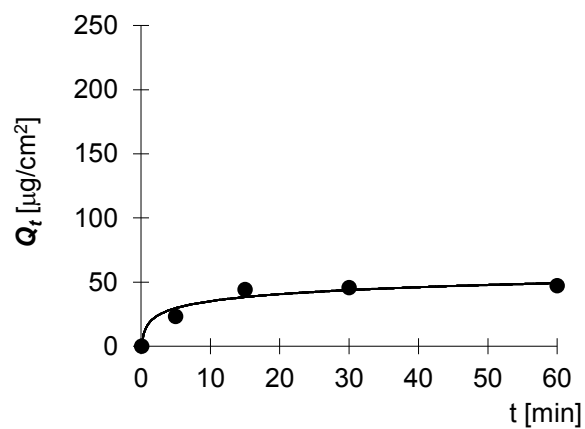
Hmotnost	1560 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,640	9	4,640	46,4	23,2
15	4,656	0,5	8,832	88,3	44,2
30	4,718	0,5	9,127	91,3	45,6
60	4,750	0,5	9,395	93,9	47,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	23,2	21,4
15	44,2	27,6
30	45,6	36,9
60	47,0	55,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,62$
Abs. člen	$q = 18,33$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 14: Liberace z membrány 1 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.1.2
----------	--------

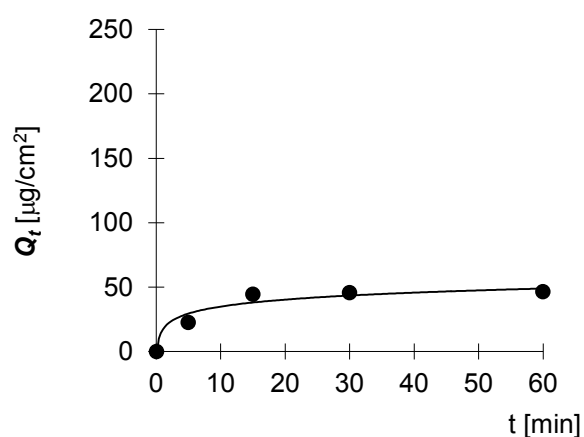
Hmotnost	1550 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,504	9	4,504	45,0	22,5
15	4,804	0,5	8,858	88,6	44,3
30	4,824	0,5	9,118	91,2	45,6
60	4,744	0,5	9,279	92,8	46,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	22,5	22,5
15	44,3	44,3
30	45,6	45,6
60	46,4	46,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,62$
Abs. člen	$q = 18,20$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 15: Liberace z membrány 1 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.1.3
----------	--------

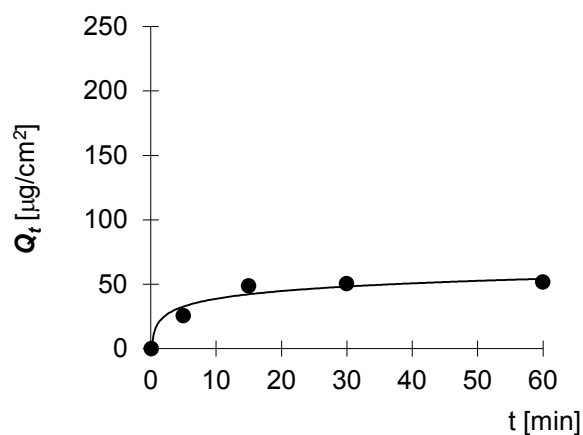
Hmotnost	1610 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	5,128	9	5,128	51,3	25,6
15	5,112	0,5	9,727	97,3	48,6
30	5,206	0,5	10,077	100,8	50,4
60	5,180	0,5	10,311	103,1	51,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	25,6	23,7
15	48,6	30,5
30	50,4	40,7
60	51,6	61,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,68
Abs. člen	q = 20,26
Korelační koef.	r = 0,73



Protokol 16: Liberace z membrány 1 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.1.4
----------	--------

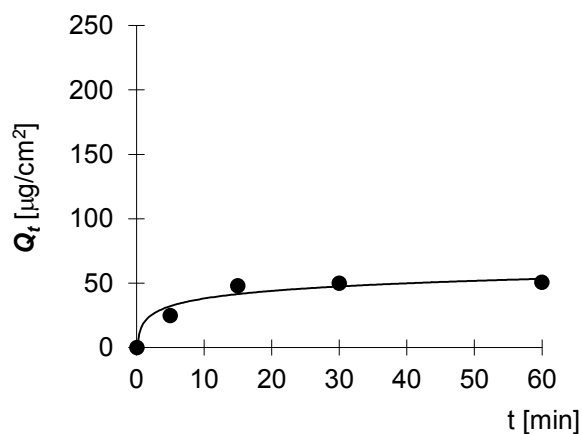
Hmotnost	1680 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,966	9	4,966	49,7	24,8
15	5,118	0,5	9,587	95,9	47,9
30	5,238	0,5	9,963	99,6	49,8
60	5,158	0,5	10,145	101,5	50,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	24,8	23,2
15	47,9	29,9
30	49,8	40,0
60	50,7	60,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,67
Abs. člen	q = 19,84
Korelační koef.	r = 0,73



Protokol 17: Liberace z membrány 2 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.2.1
----------	--------

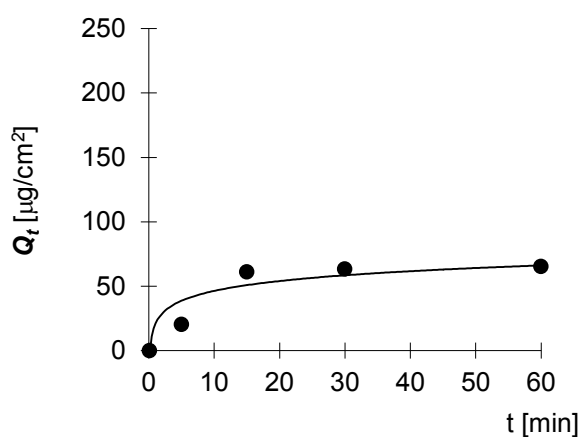
Hmotnost	2580 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,056	9	4,056	40,6	20,3
15	8,584	0,5	12,234	122,3	61,2
30	8,558	0,5	12,638	126,4	63,2
60	8,528	0,5	13,036	130,4	65,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	20,3	25,8
15	61,2	35,3
30	63,2	49,5
60	65,2	78,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,95$
Abs. člen	$q = 21,08$
Korelační koef.	$r = 0,76$



Protokol 18: Liberace z membrány 2 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.2.2
----------	--------

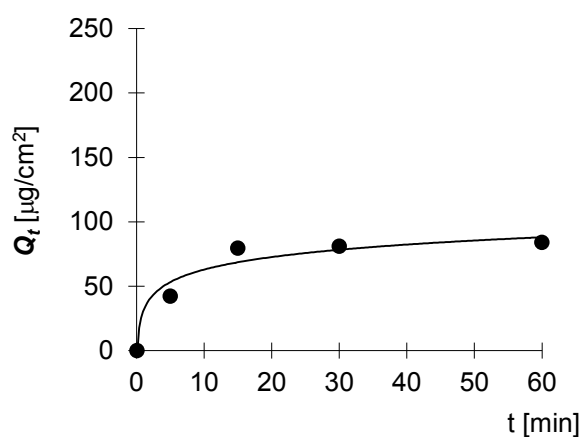
Hmotnost	2110 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	8,422	9	8,422	84,2	42,1
15	8,332	0,5	15,912	159,1	79,6
30	8,184	0,5	16,180	161,8	80,9
60	8,372	0,5	16,778	167,8	83,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	42,1	38,6
15	79,6	49,6
30	80,9	66,1
60	83,9	99,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,10$
Abs. člen	$q = 33,09$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 19: Liberace z membrány 3 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.2.3
----------	--------

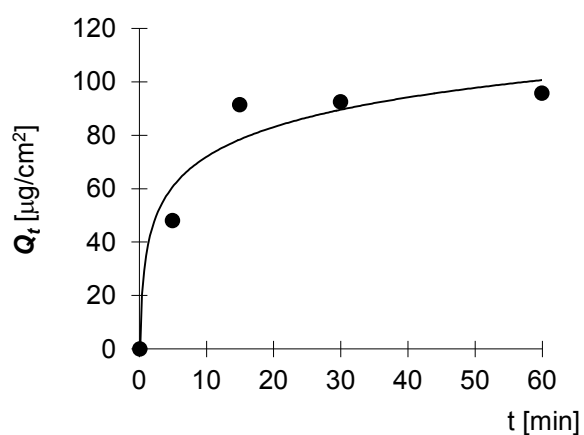
Hmotnost	2280 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	9,604	9	9,604	96,0	48,0
15	9,630	0,5	18,274	182,7	91,4
30	9,368	0,5	18,493	184,9	92,5
60	9,548	0,5	19,142	191,4	95,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	48,0	44,2
15	91,4	56,7
30	92,5	75,5
60	95,7	113,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,25$
Abs. člen	$q = 37,92$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 20: Liberace z membrány 2 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.2.4
----------	--------

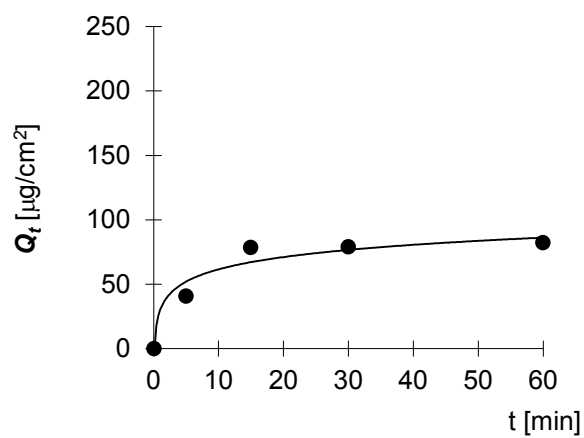
Hmotnost	1920 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	8,148	9	8,148	81,5	40,7
15	8,374	0,5	15,707	157,1	78,5
30	8,022	0,5	15,774	157,7	78,9
60	8,282	0,5	16,435	164,4	82,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	40,7	37,7
15	78,5	48,5
30	78,9	64,7
60	82,2	97,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,08$
Abs. člen	$q = 32,34$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 21: Liberace z membrány 3 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.3.1
----------	--------

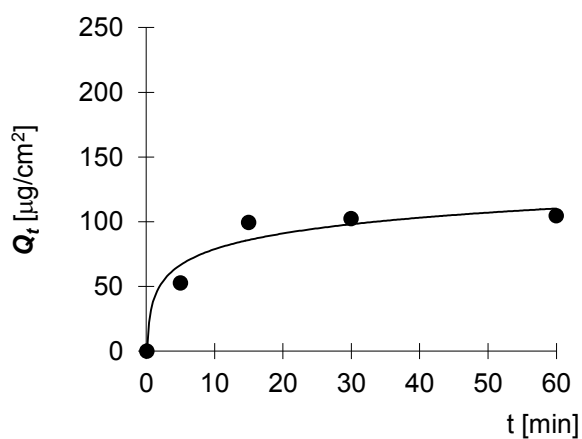
Hmotnost	3730 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	10,516	9	10,516	105,2	52,6
15	10,382	0,5	19,846	198,5	99,2
30	10,480	0,5	20,464	204,6	102,3
60	10,384	0,5	20,892	208,9	104,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	52,6	48,4
15	99,2	62,1
30	102,3	82,7
60	104,5	123,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,37$
Abs. člen	$q = 41,49$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 22: Liberace z membrány 3 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.3.2
----------	--------

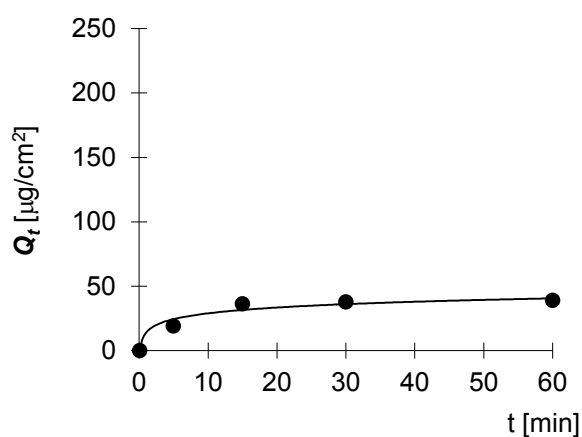
Hmotnost	3290 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	3,817	9	3,817	38,2	19,1
15	3,790	0,5	7,225	72,3	36,1
30	3,924	0,5	7,549	75,5	37,7
60	3,953	0,5	7,774	77,7	38,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	19,1	17,6
15	36,1	22,7
30	37,7	30,5
60	38,9	45,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,52$
Abs. člen	$q = 15,01$
Korelační koef.	$r = 0,74$



Protokol 23: Liberace z membrány 3 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.3.3
----------	--------

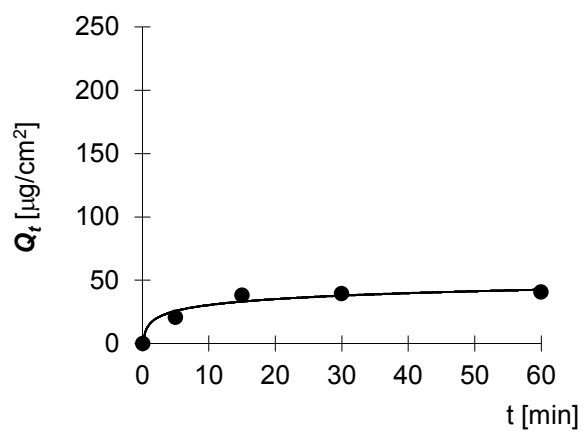
Hmotnost	3260 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,113	9	4,113	41,1	20,6
15	3,897	0,5	7,599	76,0	38,0
30	3,972	0,5	7,869	78,7	39,3
60	3,999	0,5	8,094	80,9	40,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	20,6	18,6
15	38,0	23,9
30	39,3	31,9
60	40,5	47,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,53$
Abs. člen	$q = 15,99$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 24: Liberace z membrány 3 s obsahem 30 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	30.3.4
----------	--------

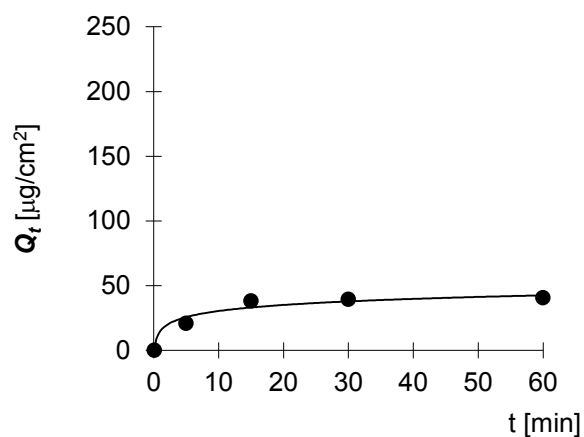
Hmotnost	2870 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	2,178	9	2,178	21,8	10,9
15	2,358	0,5	4,318	43,2	21,6
30	2,357	0,5	4,435	44,4	22,2
60	2,496	0,5	4,692	46,9	23,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
5	10,9	10,3
15	21,6	13,4
30	22,2	18,1
60	23,5	27,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,31$
Abs. člen	$q = 8,7$
Korelační koef.	$r = 0,75$



Protokol 25: Liberace z membrány 1 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.1.1
----------	--------

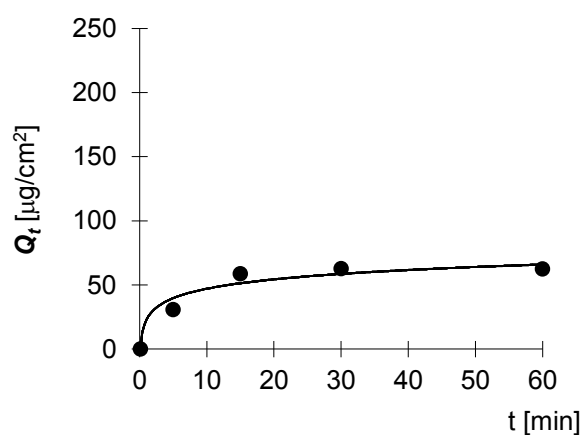
Hmotnost	1640 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	6,152	9	6,152	61,5	30,8
15	6,186	0,5	11,723	117,2	58,6
30	6,664	0,5	12,510	125,1	62,6
60	6,270	0,5	12,449	124,5	62,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	30,8	28,7
15	58,6	37,0
30	62,6	49,5
60	62,2	74,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,83$
Abs. člen	$q = 24,58$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 26: Liberace z membrány 1 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.1.2
----------	--------

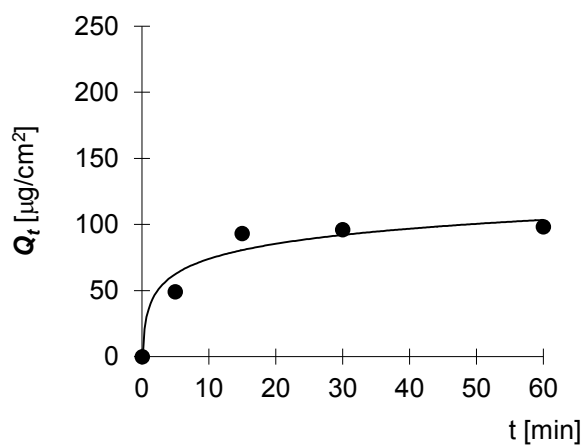
Hmotnost	1870 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	9,810	9	9,810	98,1	49,1
15	9,772	0,5	18,601	186,0	93,0
30	9,912	0,5	19,230	192,3	96,1
60	9,836	0,5	19,649	196,5	98,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	49,1	49,1
15	93,0	93,0
30	96,1	96,1
60	98,2	98,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,29$
Abs. člen	$q = 38,78$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 27: Liberace z membrány 1 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.1.3
----------	--------

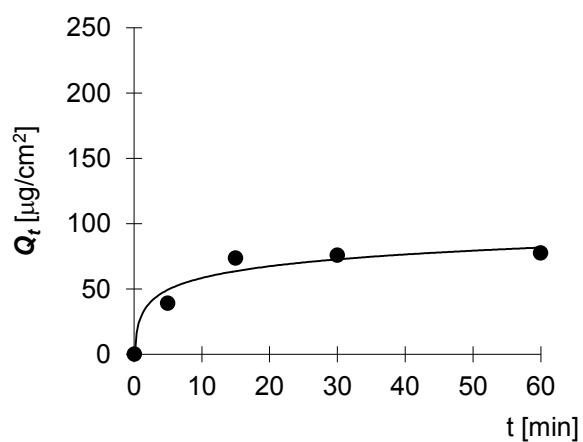
Hmotnost	1550 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	7,806	9	7,806	78,1	39,0
15	7,678	0,5	14,703	147,0	73,5
30	7,746	0,5	15,155	151,6	75,8
60	7,700	0,5	15,497	155,0	77,5

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	39,0	35,8
15	73,5	46,0
30	75,8	61,3
60	77,5	91,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,02$
Abs. člen	$q = 30,75$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 28: Liberace z membrány 1 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.1.4
----------	--------

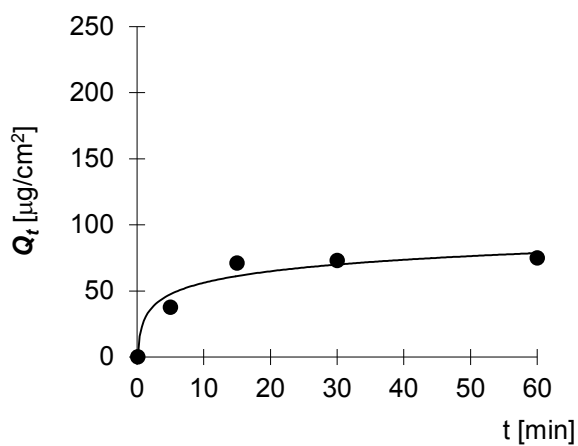
Hmotnost	1430 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	7,494	9	7,494	74,9	37,5
15	7,418	0,5	14,163	141,6	70,8
30	7,428	0,5	14,544	145,4	72,7
60	7,482	0,5	14,969	149,7	74,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	37,5	34,4
15	70,8	44,3
30	72,7	59,0
60	74,8	88,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,98$
Abs. člen	$q = 29,5$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 29: Liberace z membrány 2 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.2.1
----------	--------

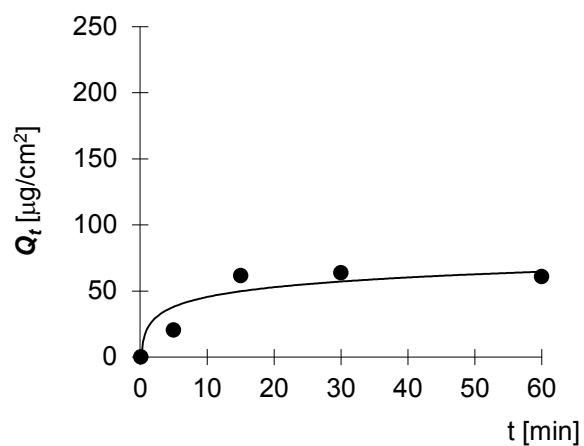
Hmotnost	2210 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	4,038	9	4,038	40,4	20,2
15	8,624	0,5	12,258	122,6	61,3
30	8,662	0,5	12,727	127,3	63,6
60	7,646	0,5	12,145	121,4	60,7

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	20,2	26,2
15	61,3	35,0
30	63,6	48,2
60	60,7	74,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,88$
Abs. člen	$q = 21,85$
Korelační koef.	$r = 0,72$



Protokol 30: Liberace z membrány 2 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.2.2
----------	--------

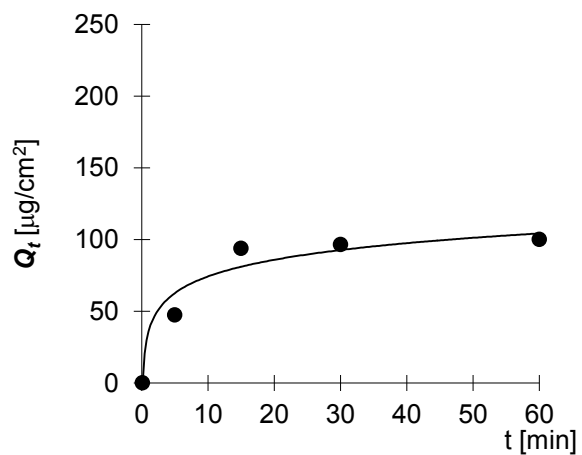
Hmotnost	2070 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	9,472	9	9,472	94,7	47,4
15	10,230	0,5	18,755	187,5	93,8
30	10,286	0,5	19,322	193,2	96,6
60	10,480	0,5	20,031	200,3	100,2

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	47,4	44,8
15	93,8	58,2
30	96,6	78,3
60	100,2	118,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,34$
Abs. člen	$q = 38,13$
Korelační koef.	$r = 0,74$



Protokol 31: Liberace z membrány 2 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.2.3
----------	--------

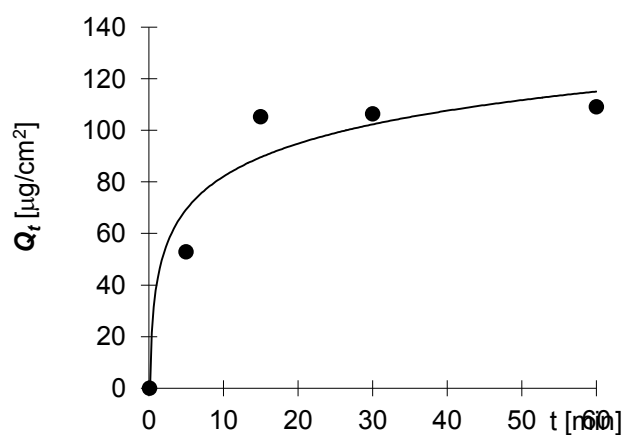
Hmotnost	2410 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	10,576	9	10,576	105,8	52,9
15	11,538	0,5	21,056	210,6	105,3
30	11,190	0,5	21,285	212,9	106,4
60	11,180	0,5	21,835	218,3	109,2

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	52,9	50,2
15	105,3	64,6
30	106,4	86,3
60	109,2	129,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,44$
Abs. člen	$q = 42,97$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 32: Liberace z membrány 2 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.2.4
----------	--------

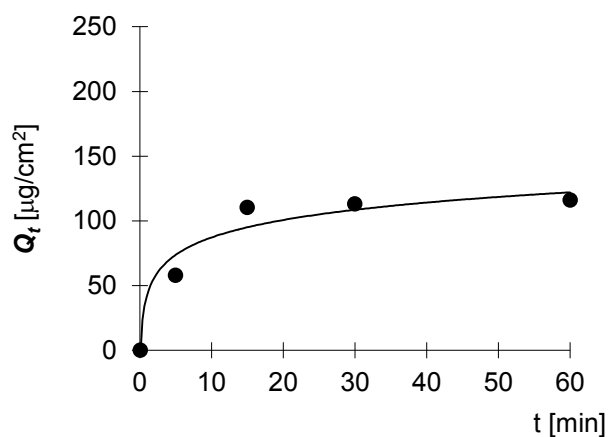
Hmotnost	2230 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	11,546	9	11,546	115,5	57,7
15	11,654	0,5	22,045	220,5	110,2
30	11,622	0,5	22,596	226,0	113,0
60	11,634	0,5	23,189	231,9	115,9

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	57,7	53,4
15	110,2	68,7
30	113,0	91,6
60	115,9	137,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,53$
Abs. člen	$q = 45,77$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 33: Liberace z membrány 3 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.3.1
----------	--------

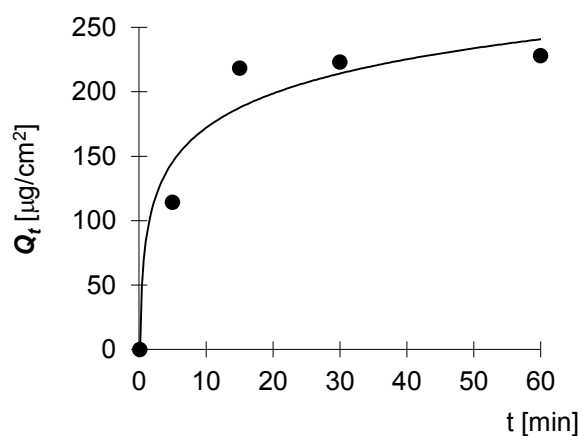
Hmotnost	4410 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	22,826	9	22,826	228,3	114,1
15	23,102	0,5	43,645	436,5	218,2
30	22,920	0,5	44,619	446,2	223,1
60	22,738	0,5	45,583	455,8	227,9

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	114,1	105,7
15	218,2	135,7
30	223,1	180,6
60	227,9	270,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 2,99$
Abs. člen	$q = 90,75$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 34: Liberace z membrány 3 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.3.2
----------	--------

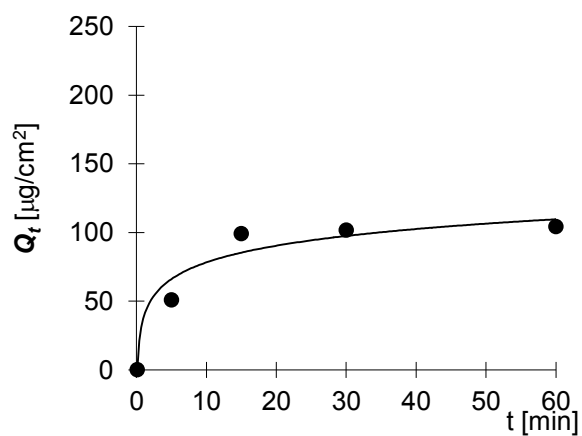
Hmotnost	4250 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	10,178	9	10,178	101,8	50,9
15	10,654	0,5	19,814	198,1	99,1
30	10,663	0,5	20,356	203,6	101,8
60	10,642	0,5	20,868	208,7	104,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	50,9	47,7
15	99,1	61,5
30	101,8	82,2
60	104,3	123,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,38$
Abs. člen	$q = 40,79$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 35: Liberace z membrány 3 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.3.3
----------	--------

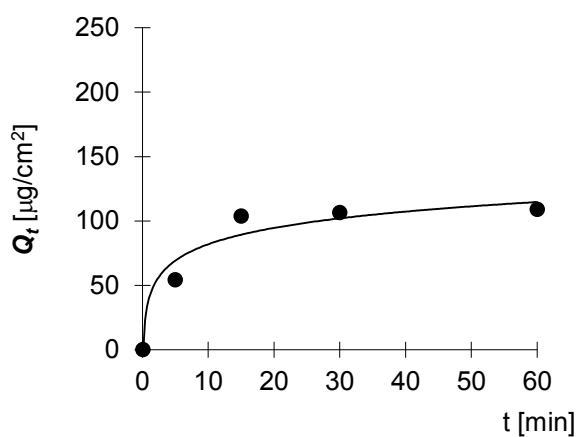
Hmotnost	4320 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	10,837	9	10,837	108,4	54,2
15	10,969	0,5	20,722	207,2	103,6
30	10,963	0,5	21,265	212,6	106,3
60	10,922	0,5	21,772	217,7	108,9

t	$Q_t \text{ (exp)}$	$Q_t \text{ (teor)}$
5	54,2	50,2
15	103,6	64,5
30	106,3	86,0
60	108,9	129,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,43$
Abs. člen	$q = 43,03$
Korelační koef.	$r = 0,73$



Protokol 36: Liberace z membrány 3 s obsahem 40 % diaminu

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[$\mu\text{g/ml}$]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[$\mu\text{g/ml}$]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve V_o/cm^2

$V_o =$	10
---------	----

Membrána	40.3.4
----------	--------

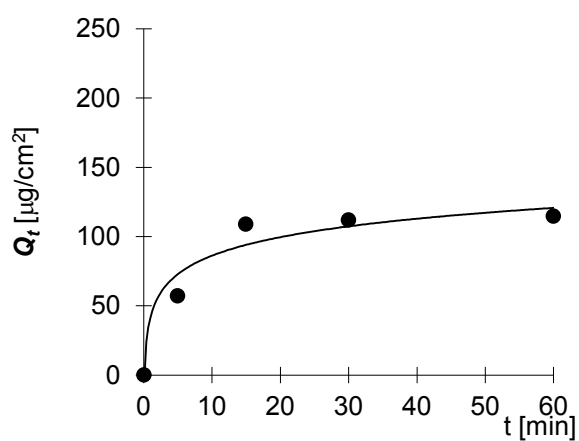
Hmotnost	4400 μg
----------	--------------------

Měření:	diamin
---------	--------

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
5	11,410	9	11,410	114,1	57,1
15	11,510	0,5	21,779	217,8	108,9
30	11,526	0,5	22,371	223,7	111,9
60	11,508	0,5	22,929	229,3	114,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	57,1	52,8
15	108,9	67,9
30	111,9	90,5
60	114,6	135,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,51$
Abs. člen	$q = 45,24$
Korelační koef.	$r = 0,73$

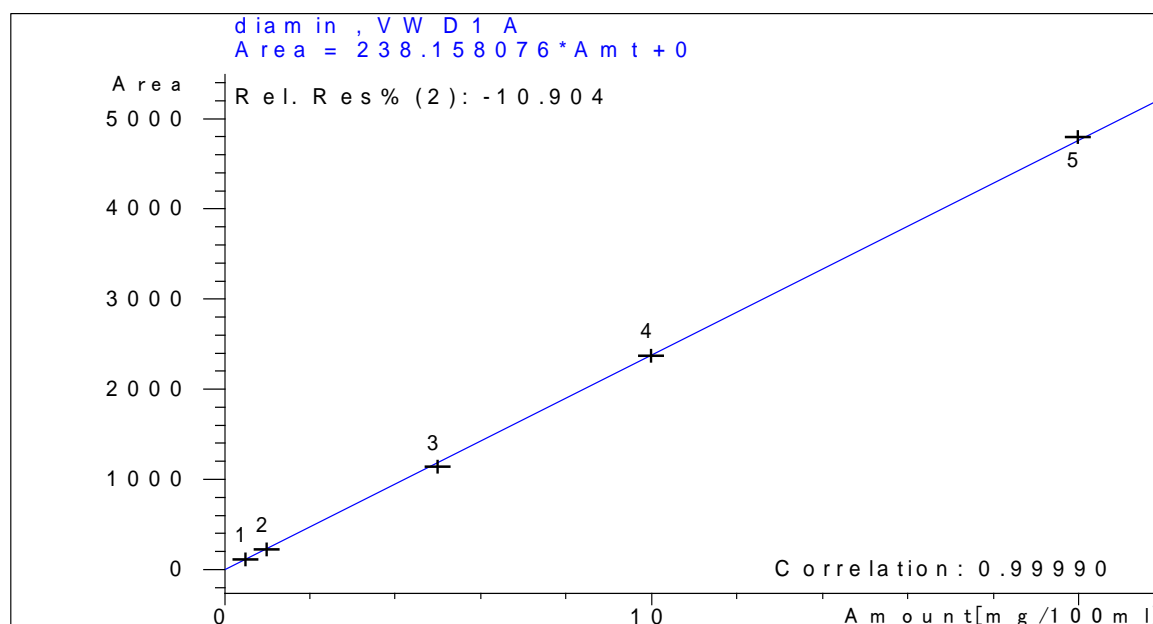


6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Kalibrační závislost

K HPLC stanovení diaminu ve vzorcích akceptorové fáze liberačních pokusů byla na katedře předem vypracována metodika stanovení léčiva (Petr Vrbata, Pavel Berka, katedry farm. technologie) modifikovaná tak, aby vyhovovala rychlému sériovému stanovení. Pro potřeby dokumentace uvádím na **Obr. 1** její hlavní parametry v podobě kalibračního výstupu softwaru ChemStation při vlnové délce 270 nm a retenčním čase diaminu 4,8 minuty.

Obr. 6.1: Kalibrační parametry HPLC stanovení diaminu



Je zřejmé, že v proměřeném rozpětí koncentrací diaminu je kalibrační závislost absorbance na koncentraci přímková.

Kalibrační rovnice měla konkrétně tvar

$$A = 238,16 C + 0, \quad \text{ve které:}$$

A Plocha pod píkem

C koncentrace v mg diaminu/100 ml

Její korelační koeficient činil $r = 0,99990$, proto rovnice plně vyhovovala.

6.2 Liberace diaminu z nanovláknenných membrán

Všechny důležité primární výsledky z liberačních pokusů jsou uvedeny v části **5. Dokumentace** a ilustrovány na pracovních grafech **protokolů 1 až 35**. Na nich jsou znázorněny příslušné liberační profily diaminu, z nichž je patrné, že k uvolnění prakticky veškerého uvolnitelného podílu diaminu docházelo vždy do 15 minut od počátku liberace.

Proto byly jako hlavní parametr rychlosti uvolňování zvoleny hodnoty pseudostacionárního fluxu J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] diaminu odečtené do 15. minuty pokusu. Jejich vyčíslení nečinilo problémy, neboť daný úsek liberace byl vždy dobře proložitelný přímkou. Tyto hodnoty lineárních pseudostacionárních fluxů jsou níže uvedeny v souhrnné **Tabulce 1**. Na rozdíl od hodnot logaritmického fluxu, které jsou vyčísleny v jednotlivých protokolech, je jejich interpretace jednodušší.

V prvních čtyřech řádcích tabulky jsou uvedeny příslušné hodnoty náležející membránám vyrobeným technologickým postupem pod kódem 1, druhá čtveřice (vyznačená žlutě) obsahuje analogické hodnoty pro postup 2 a třetí čtveřice hodnoty naměřené pro vzorky z technologického postupu 3.

Pro každou ze 3 koncentrací diaminu v nanovlákněch jde vždy o hodnoty lineárních fluxů (J) diaminu, hmotnosti (N) jednotlivých vzorků testovaných membrán (o ploše $2,0 \text{ cm}^2$), průměrné hmotnosti \bar{N} s níže uvedenými hodnotami příslušné relativní směrodatné odchylky RSD (%) a průměrné hodnoty fluxů \bar{J} také s níže uvedenými hodnotami RSD (%).

Prvním zřetelným poznatkem, který výsledky z **Tab 1**. přinášejí, je ten, že hodnoty těchto fluxů nejsou primárně určeny koncentrací léčiva ve vlákněch, zato zřetelně souvisejí s jejich plošnou hmotností. Stačí si přitom porovnat hodnoty průměrných fluxů

membrán vyrobené za podmínek prvního technologického parametru.

Například průměrná hodnota při 20 % diaminu v membráně činí $\bar{J}_1 = 9,2$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] a \bar{J}_1 při 30 % diaminu je více než 3krát vyšší (3,1 krát), když odpovídající poměr plošných hmotností je téměř 3 krát vyšší (2,9 krát). V případě, že nanovláknata mají v obou případech stejný průměr, by pak jednoduché vysvětlení spočívalo v tom, že při větší gramáži nanovláken s léčivem je k dispozici větší rozpouštěcí povrch a celková rychlost liberace z celého dostupného povrchu je tedy také úměrně vyšší. Tento fakt

vypadá z kvalitativního hlediska triviálně, bude však muset být brán v úvahu při případných faktorových pokusech jako zásadně významný.

Tab. 1: Souhrnné výsledky liberace diaminu z nanovláknenných membrán

Koncentrace diaminu 20%			Koncentrace diaminu 30%			Koncentrace diaminu 40%		
flux J $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$	hmotn.N $\mu\text{g}/2\text{cm}^2$	průměr RSD (%)	flux J $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$	hmot. N $\mu\text{g}/2\text{cm}^2$	průměr RSD (%)	flux J $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$	hmot.N $\mu\text{g}/2\text{cm}^2$	průměr RSD (%)
9,24	6710	N1=6897	2,95	1560	N1=1600	3,92	1640	N1=1622
9,15	5950	11%	2,96	1550	4%	6,22	1870	11%
8,88	7850	J1=9,2	3,25	1610	J1=3,1	4,92	1550	J1=5,0
9,49	7080	3%	3,21	1680	5%	4,73	1430	19%
8,54	7560	N2=7650	4,09	2580	N2=2222	4,10	2210	N2=2230
10,88	9230	16%	5,32	2110	13%	6,27	2070	6%
12,26	7590	J2=9,9	6,11	2280	J2=5,2	7,04	2410	J2=6,2
7,89	6220	21%	5,25	1920	16%	7,37	2230	24%
8,26	6130	N3=7617	6,63	3730	N3=3287	14,59	4410	N3=4345
4,07	7720	18%	2,31	3290	11%	6,62	4250	2%
6,40	9370	J3=6,0	2,54	3260	J3=3,2	6,93	4320	J3=8,8
5,45	7250	29%	1,44	2870	72%	6,96	4400	44%

K ukázce toho, co z naměřených výsledků vyplývá, lze využít grafické znázornění na **Obr. 6.2**. Jsou na něm uvedeny průměrné hodnoty fluxů **J** diaminu ($n = 4$) ve startovní, lineární části liberace spolu s vyznačením hodnot směrodatných odchylek (SEM) těchto průměrů.

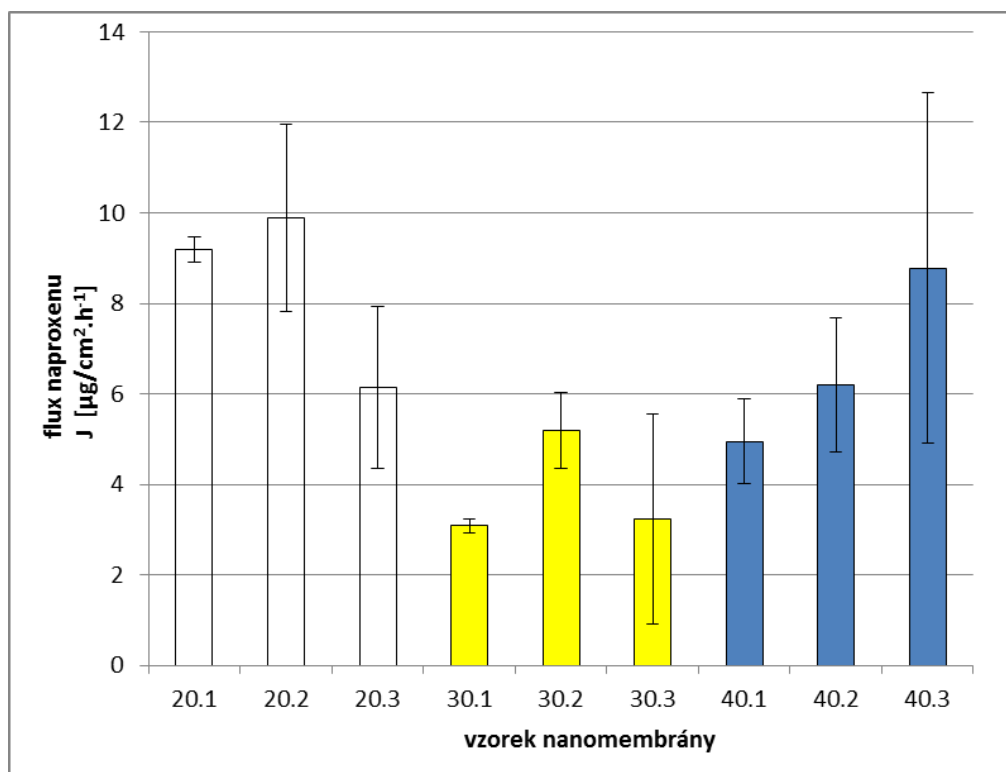
Z pohledu na variabilitu získávaných dat ve vztahu k nesespecifikovanému technologickému parametru (údaj je u výrobce) na úrovni 1 (bílá pole), 2 (žlutá pole), nebo 3 (modré sloupce) je zřejmé, že v uvedeném pořadí narůstají také hodnoty směrodatných odchylek jednotlivých výběrů. Lze tedy nejspíše doporučit režim, který odpovídá parametru na úrovni 1.

Při spojení obou hledisek hodnocení, tedy rychlosti počátečního nástupu liberace a variability dat, dále zjistíme, že stejné rychlosti liberace lze dosáhnout s vyšší gramáží vláken o nižším, konkrétně 20% obsahu účinné látky, jako při liberaci z nanovláken se 40 % koncentrací diaminu ale nižší, zhruba poloviční gramáží.

Podobně zajímavých příkladů lze při analogickém srovnávání najít více, ale podstatná je přitom celková variabilita naměřených liberačních fluxů. Ta je jednoznačně

nejvyšší při uplatnění technologického parametru na úrovni 3. Naopak výrazně nejnižší a pro praktické využití určitě nejvýhodnější je při úrovni 1.

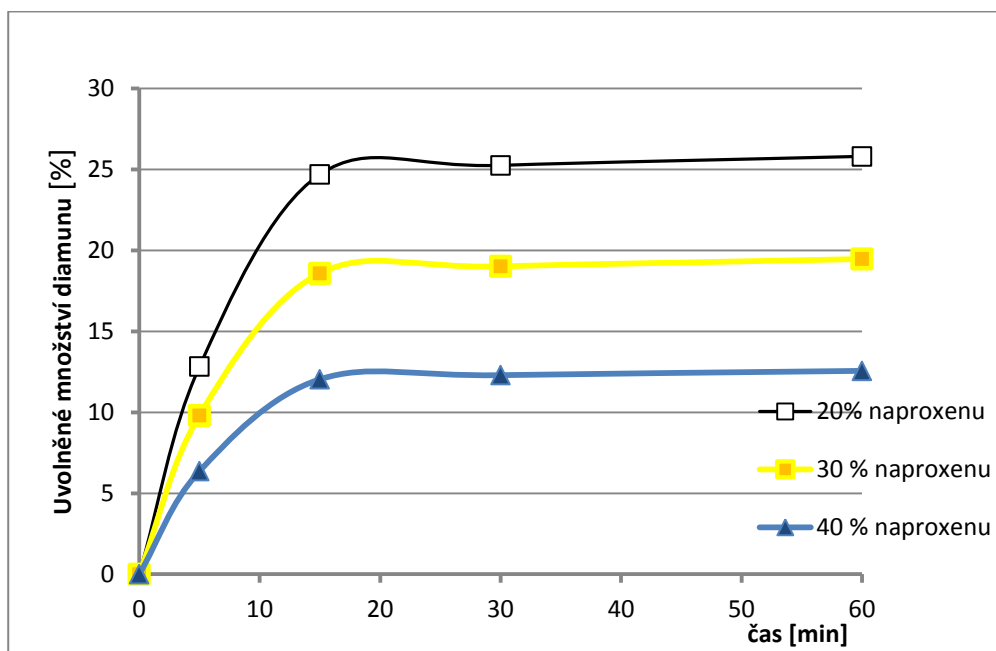
Obr. 6.2: Flux diaminu v počátečním 15. minutovém úseku liberace z membrán



Další, do značné míry překvapivé, výsledky přineslo znázornění do podoby grafu na **Obr. 6.3**. Skutečnost, že největší podíl uvolnitelného léčiva poskytují v 60. minutovém pokusu nanovlákněné membrány s nejnižším procentuálním obsahem diaminu je totiž možné považovat za nečekané.

Tak jako v případě rychlosti liberace je i v tomto případě možné říci, že pokud mají nanovláknena u všech vzorků membrán stejný průměr, lze předpokládat, že větší gramáž nanovláken s léčivem vytváří a dává k dispozici větší rozpouštěcí povrch pro liberaci léčiva z membrány. Při dobré smáčivosti je celkový uvolnitelný podíl diaminu nejvyšší právě u nanovlákněné membrány s nejvyšší gramáží.

Obr. 6.3: Liberační profily z nanomembrán s obsahem 20 %, 30 % a 40 % diaminu



V tomto smyslu proto bude muset být brán také tento fakt do úvahy v dalších pracích.

7 ZÁVĚRY

1. K uvolnění prakticky veškerého uvolnitelného podílu diaminu docházelo vždy do 15 minut od počátku liberace.

2. Rychlost liberace diaminu z nanovlákných membrán je vysoká a patrně není významněji závislá na koncentraci léčiva ve vláknech membrány, zásadně je však nastavitelná gramáží membrán.

3. Variabilita hodnot fluxů diaminu v počátečním 15. minutovém úseku liberace byla výrazně nejvyšší pro nastavení technologického výrobního parametru na úrovni 1. Při něm se pohybovaly hodnoty relativní směrodatné odchylky na úrovni 3 %, resp. 5 % pro membrány s deklarovaným obsahem 20 %, resp. 30 % diaminu.

4. Míra uvolnitelného podílu diaminu poskytuje podobně protichůdný výsledek. Největší, asi čtvrtinový podíl, vztaženo k teoretickému obsahu léčiva, se uvolnil z membrán s obsahem 20 % diaminu avšak s nejvyšší gramáží. Naopak nejmenší, asi poloviční (tj. 12,5 %) podíl diaminu se uvolnil z membrán s dvojnásobnou koncentrací léčiva, avšak o třetinu nižší gramáží.

Zjištěná fakta poukazují v případě testovaných nanovlákných membrán na nutnost důkladného prověřování všech, intuitivně třeba jednoduchých, závislostí mezi technicky dobře nastavitelnými parametry membrán a liberačními vlastnostmi jejich finálních produktů.

8 LITERATURA

- ¹ Drews J, Ryser S: Classic drug targets. *Nat Biotechnol*, 15, 1997, 1318-1319.
- ² Overington J P, Al-Lazikani B, Hopkins AL: How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 5, 2006, 993-6.
- ³ Ruenraroengsak P, Cook JM, Florence AT: Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. *J Control Rel*, 141, 2010, 265–76.
- ⁴ Bromberg L., Polymeric micelles in oral chemotherapy. *J Control Rel*, 128, 2008, 99-112.
- ⁵ Yamanaka YJ, Leong KW. Engineering strategies to enhance nanoparticle mediated oral delivery. *J Biomater Sci Polym Ed*, 19, 2008, 1549–70.
- ⁶ Gaucher G, Satturwar P, Jones MC, Furtos A, Leroux J C: Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 76, 2010, 147–58.
- ⁷ Giménez B G, Santos MS, Ferrarini M, Dos Santos Fernandes J P: Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. *Pharmazie*, 65, 2010, 148-152.
- ⁸ Sastry SV, Nyshadham JR, Fix JA: Recent technological advances in oral drug delivery. *PSTT*, 3, 2000, 138-164.
- ⁹ Mogshimi SM, Hunter AC: Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, 19, 2005, 311-30.
- ¹⁰ Ignatious F, Sun L, Lee C-P, Baldoni J: Electrospun nanofibers in oral drug delivery (Review) *Pharm Res*, 27, 2010, 576-588.
- ¹¹ Mrsny R J: Oral drug delivery research in Europe. *J Control Rel*, 161, 2012, 247-253.
- ¹² Corr SC, Gahan CC, Hill C: M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52, 2008, 2–12.
- ¹³ Kyd JM, Cripps AW: Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine*, 26, 2008, 6221–4.
- ¹⁴ Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW: Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today*, 10, 2005, 1145–57.

-
- ¹⁵ Hunter ACh, Elsom J, Wibroe PP, Moghimi SM: Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: A pathophysiological perspective. *Maturitas*, 73, 2012, 5–18.
- ¹⁶ Bernkop-Schnurch A, Smitz T: Presystemic metabolism of orally administered peptid drugs and strategies to overcome it. *Cur Drug Metab*, 8, 2007, 509-517.
- ¹⁷ McConnell EL, Fadda HM, Basit AW: Gut instinct: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm*, 364, 2008, 213-226.
- ¹⁸ Calhoun DL, Waskin H, White M P. et al: Treatment of Systematic Sporotrichosis with Ketoconazole. *Clin Inf Dis*, 13, 1989, 47-51.
- ¹⁹ Blum R A, D'Andrea T, Florentino, BM, Wilton JH. Hilligoss DM, Gardner, J.H, et al.: Increased Gastric pH and the Bioavailability of Fluconazole and Ketoconazole *Ann Intern Med.*, 114, 1991, 755-757.
- ²⁰ Chin, T W., Loeb M, Fong I W: Effects of an acidic beverage (Coca-Cola) on absorption of ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 1995, 1671-1675.
- ²¹ Matsui T, Motomura A, Arita M, Takeyama Y, Sakurai T, Yao T: Control of gastric pH with ranitidine in patients with Crohn's disease receiving total parenteral nutrition. Comparison of two intravenous regimens. *J Gastroenterol*, 31, 1996, 6-11.
- ²² Abu-Diak OA, Jones DS, Andrews GP: An investigation into the dissolution properties of celecoxib melt extrudates: understanding the role of polymer type and concentration in stabilizing supersaturated drug concentrations, *Mol Pharm*, 8, 2011, 1362-1371.
- ²³ Erel I, Schlaad H, Demirel AL: Effect of structural isomerism and polymer endgroup on the pH-stability of hydrogen-bonded multilayers, *J Colloid Interface Sci*, 361, 2011, 477-482.
- ²⁴ Gavini E, Spada D, Rassu G, Cerri G, Brundu A, Cossu M, Sorrenti M, Giunchedi P: Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl-betacyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium, *J Pharm Pharmacol*, 63, 2011, 472-482.
- ²⁵ Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA: Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* 4, 2008, 273–82.

-
- ²⁶ Passerini N, Perissutti B, Albertini E, Franceschinis D, Lenaz D, Hasa I, Locatelli D, Voinovich D: A new approach to enhance oral bioavailability of Silybum Marianum dry extract: Association of mechanochemical activation and spray congealing. *Phytomedicine* 19, 2012, 160-8.
- ²⁷ Iannuccelli V, Montanari V, Bertelli M, Pellati D, Coppi FG: Microparticulate polyelectrolyte complexes for gentamicin transport across intestinal epithelia, *Drug Deliv*, 18, 2011, 26-37.
- ²⁸ Charef S, Papy-Garcia D, Courty J: Absorption and tissue distribution of a novel carboxymethyl dextran after oral administration. *Biomed Pharmacother*, 64, 2010, 627-362.
- ²⁹ Bellmann-Sickert K, Beck-Sickinger A.G: Peptide drugs to target G protein coupled receptors, *Trends Pharmacol Sci*, 31, 2010, 434-441.
- ³⁰ Yanez JA, Wang SW, Knemeyer IW, Wirth M.A, Alton KB: Intestinal lymphatic transport for drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 923-942.
- ³¹ Parmentier J, Hartmann FJ, Fricker G: In vitro evaluation of liposomes containing bioenhancers for the oral delivery of macromolecules. *Eur J Pharm Biopharm*, 76, 2010, 394-403.
- ³² Ferreira SA, Pereira P, Sampaio P, Coutinho P.J, Gama FM: Supramolecular assembled nanogel made of mannan, *J Colloid Interface Sci*, 361, 2011, 97-108.
- ³³ L. Plapied, G. Vandermeulen, B. Vroman, V. Preat, A. des Rieux, Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery, *Int J Pharm*, 398, 2010, 210-218.
- ³⁴ J. Iqbal, C. Vigl, G. Moser, M. Gasteiger, G. Perera, A. Bernkop-Schnurch: Development and in vivo evaluation of a new oral nanoparticulate dosage form for leuprolide based on polyacrylic acid, *Drug Deliv*, 18, 2011, 432-440.
- ³⁵ M.J. Santander-Ortega, J.M. Peula-Garcia, F.M. Goycoolea, J. L. Ortega-Vinuesa: Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 82, 2011, 571-580.

-
- ³⁶ G. Millotti, G. Perera, C. Vigl, K. Pickl, F.M. Sinner, A. Bernkop-Schnurch, The use of chitosan-6-mercaptopnicotinic acid nanoparticles for oral peptide drug delivery, *DrugDeliv*, 18, 2011, 190-197.
- ³⁷ D. Teutonico, G. Ponchel, Patches for improving gastrointestinal absorption: an overview, *Drug Discov Today*, 16, 2011, 991-7.
- ³⁸ Cheng WP, Thompson C. Ryan SM, Aguirre T, Tetley L, Brayden DJ: In vitro and in vivo characterisation of a novel peptide delivery system: amphiphilic polyelectrolyte-salmon calcitonin nanocomplexes, *J Control Rel*, 147, 2010, 289-297.
- ³⁹ G. Muller, Oral Delivery of Protein Drugs: Driver for Personalized Medicine, *Curr Issues Mol Biol*, 13, 2010, 13-24.
- ⁴⁰ K. Wening, J. Breitzkreutz, Oral drug delivery in personalized medicine: unmet needs and novel approaches, *Int J Pharm*, 404, 2011, 1-9.
- ⁴¹ G. Garbacz, S. Klein, W. Weitschies, A biorelevant dissolution stress test device - background and experiences, *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 2010, 1251-1261.
- ⁴² C.C. Wagner, A. Rusca, K. Kletter, M. Tschurlovits, S. Pace, A. Longo, M. Pedrani, R. Villa, E. Frimonti, M. Muller, M. Brunner, Plasma pharmacokinetics and gastrointestinal transit of a new Propionyl-L-Carnitine controlled release formulation, *Xenobiotica*, 41(11), 2011, 988-95.
- ⁴³ Almeida A, Possemiers S, Boone MN, De Beer T, Quinten T, Van Hoorebeke T, Remon JP, Vervaet C: Ethylene vinyl acetate as matrix for oral sustained release dosage forms produced via hot-melt extrusion. *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 2011, 297-305.
- ⁴⁴ Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*, 5, 2008, 496-504.